

**EINFLUSS VON DEFINIERTER HYPOXIE UND ZELLDICHTE AUF DIE EXPRESSION VON
STAMMZELLGENEN UND DIE GENEXPRESSION DER PROLYL HYDROXYLASE 3 (PHD3)
BEI FETTABGELEITETEN STAMMZELLEN DES MENSCHEN**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jennifer Rebhan
geboren am 04.07.1987 in Sonneberg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Maria Wartenberg**
- 2. Prof. Dr. Orlando Guntinas-Lichius**
- 3. Prof. Dr. Gustav Steinhoff**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	7
2	Zusammenfassung.....	11
3	Einleitung	13
3.1	Embryonale Stammzellen.....	13
3.2	Adulte mesenchymale Stammzellen.....	13
3.3	<i>Human Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASCs)</i>	14
3.3.1	Bedeutung von hASCs in der Regenerativen Medizin	14
3.3.2	Oberflächenmarker	15
3.3.3	Multipotentes Differenzierungspotential.....	15
3.3.4	Embryonale Gene	16
3.3.4.1	NANOG.....	17
3.3.4.2	Sox-2.....	17
3.3.4.3	Oct3/4	17
3.3.5	Proliferationsmarker	18
3.3.5.1	Rex-1	18
3.4	Hypoxie.....	18
3.4.1	Regulation durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren Hif 1 α , Hif 2 α und Hif 3 α ...	20
3.4.2	Die Prolyl Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 werden durch Hypoxie-induzierbare Faktoren (Hif) reguliert.....	22
3.4.3	Zielgene der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (Hif)	22
3.4.4	Einfluss von Hypoxie auf hASCs	23
3.5	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	23
3.5.1	Entstehung von ROS <i>in vivo</i>	23
3.5.2	Einfluss von ROS auf die Differenzierung von hASCs.....	24
3.6	Zelldichte.....	25
3.6.1	<i>Gap junctions</i> zur Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten	25
3.6.2	Einfluss von <i>gap junctions</i> auf hASCs.....	25
4	Ziele der Arbeit	27
5	Material.....	28
5.1	Zelllinie	28
5.2	Patienten.....	28
5.3	Substanzen.....	29
5.3.1	Primer	29
5.3.2	Antikörper	30
5.4	Chemikalien.....	32

5.5	Verbrauchsmaterialien	33
5.6	Laborgeräte	34
5.7	Software.....	34
6	Methoden	35
6.1	Zellisolation.....	35
6.2	Zellkultur.....	36
6.3	Analyse von Oberflächenmarkern	37
6.3.1	Durchflusszytometrie.....	37
6.3.2	Detektion der Immunfluoreszenz.....	37
6.4	Analyse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie (IHC).....	37
6.4.1	Färbung	37
6.4.2	Detektion der Immunfluoreszenz.....	38
6.5	Analyse der mRNA-Expression	38
6.5.1	RNA-Isolation.....	38
6.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	38
6.5.3	cDNA Synthese.....	39
6.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
6.5.5	Gelelektrophorese.....	41
6.5.6	<i>Real-Time</i> PCR.....	42
6.6	Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot.....	43
6.6.1	Proteinisolation	43
6.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	43
6.6.3	SDS-PAGE	44
6.6.4	Western Blot	45
6.6.5	Detektion von Immunproteinbanden.....	46
6.7	Zellvitalität.....	46
6.8	Statistik.....	47
7	Ergebnisse.....	48
7.1	Charakterisierung der Oberflächenmarker von hASCs.....	48
7.2	Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2, Oct3/4 und des Proliferationsmarkers Rex-1 in hASCs.....	50
7.3	Einflussfaktoren auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	51
7.3.1	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	51
7.3.2	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) mit anschließender Normoxie (21% O ₂) auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	54
7.3.3	Einfluss von verlängerter Expositionsdauer unter Hypoxie auf embryonalen Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	56

7.3.4	Einfluss von chemischer Hypoxie durch DFX auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	57
7.3.5	Einfluss von Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	58
7.3.6	Einfluss der Verlängerung der Inkubationszeit mit H ₂ O ₂ auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs	60
7.4	Vermittlung der Wirkung von Einflussfaktoren	62
7.4.1	Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3) als Sauerstoffsensor in hASCs	62
7.4.1.1	Wirkung von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs	62
7.4.1.2	Wirkung von chemischer Hypoxie vermittelt durch DFX und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs ..	64
7.4.1.3	Wirkung von Hypoxie (3% O ₂) und anschließender Normoxie (21% O ₂) auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs	66
7.4.2	Hypoxie-induzierbarer Faktor Hif 1α als Signalmolekül für Hypoxie in hASCs	67
7.4.2.1	Wirkung von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von Hif 1α in hASCs	67
7.4.2.2	Wirkung von chemischer Hypoxie mittels DFX und Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) auf die mRNA-Expression von Hif 1α in hASCs	70
7.4.3	Connexine als Transmembranproteine zur Kommunikation zwischen Zellen in hASCs	71
7.4.3.1	Wirkung von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von GJA1 in hASCs	71
7.4.4	Untersuchung der Wirkung von Inkubationsbedingungen auf hASCs	72
8	Diskussion	74
8.1	Charakterisierung der mesenchymalen Oberflächenmarker in hASCs	74
8.2	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 in hASCs	75
8.3	Einfluss von ROS auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 in hASCs	77
8.4	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs	79
8.5	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von Hif 1α in hASCs	81
8.6	Einfluss von Hypoxie (3% O ₂) und Zelldichte auf Connexine	83
9	Schlussfolgerungen	85
10	Literatur- und Quellenverzeichnis	87
11	Anhang	96
11.1	Ethikvotum	96

11.2	Lebenslauf.....	97
11.3	Publikationen und Posterbeiträge	98
11.4	Danksagung	99
11.5	Ehrenwörtliche Erklärung	100

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APS	Ammoniumopersulfat
ARNT	<i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>Body Mass Index</i> [kg/m ²]
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cLSM	<i>confocal Laser Scanning Microscope</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
Cx	Connexin
d	<i>day</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFX	Deferoxamin-Mesylat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i>
EGLN	<i>Egglaying Defective Nine Homologue</i>
EthD-2	Ethidium-Homodimer-2
FACS	<i>Fluorescenc Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FIH (HIF1AN)	<i>Factor Inhibiting Hif</i>
GAPDH	Gluceraldehyd-3-phophat-dehydrogenase
GJA1	<i>Gap junction alpha-1 protein</i>
GLUT	Glukosetransporter
GUSB	Glucuronidase Beta
h	<i>hour</i>
hASCs	<i>Human Adipose Tissue Derived Stem Cells</i>
hESC	<i>Human Embryonic Stem Cells</i>
hHSCs	<i>Human Hematopoietic Stem Cells</i>
Hif	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIF1AN (FIH)	Hif 1 α -Inhibitor
hMSC	<i>Human Mesenchymal Stem Cells</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRE	<i>Hypoxia-Response Elements</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ICC	Immuncytochemie
IGF	<i>Insulin-Like-Growth Factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie

IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonooxid-Synthase
iPS	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
min	<i>minute</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEAA	<i>Non Essential Amino Acids</i>
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK	Negativkontrolle
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NOX	NADPH Oxidase
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ • ⁻	Superoxidanion
ODDD	<i>Oxygen Dependant Degradation Domain</i>
OH•	Hydroxylradikal
p	Passage
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PHD	<i>Prolyl Hydroxylase Domain Containing Protein</i>
PIC	Phosphat Inhibitor Cocktail

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POU	Pit-Oct-Unc
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
s	<i>second</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SOV	<i>Sodium Orthovanadate</i>
SVF	<i>Stromal Vascular Fraction</i>
T _a	<i>Anneling-Temperatur [°C]</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TNF α	Tumornekrosefaktor α
μ M	Mikromolar
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	Western Blot

2 Zusammenfassung

Sowohl die Plastizität von humanen ASCs, als auch ihre mögliche *in vivo*- und *in vitro*-Beeinflussung, sind bereits gut erforscht. Bisher ist allerdings wenig darüber bekannt, wie sich die Einflussfaktoren definierte Zelldichte und reduzierter Sauerstoffgehalt auf das Differenzierungsverhalten von hASCs auswirken und wie diese Zellen solche veränderten Umgebungsbedingungen wahrnehmen.

Aus diesem Grund wurde untersucht, wie diese physiologischen Faktoren die Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 sowie des Proliferationsmarkers Rex-1 beeinflussen und welcher Mechanismus auf zellulärer Ebene die Veränderungen verursacht. Mittels Durchflusszytometrie wurden isolierte humane Stammzellen des Fettgewebes als positiv für CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 sowie negativ für CD31, CD34 und CD133 charakterisiert. Die mRNA-Expression embryonaler Gene in hASCs blieb während der Kultivierung in standardisiertem Medium über mehrere Passagen stabil. Signifikante Veränderungen konnten allerdings durch eine Erhöhung der Zelldichte auf 60.000 Zellen pro ml und gleichzeitiger Reduktion des Sauerstoffgehaltes auf 3% erzielt werden. Hierbei stieg die relative mRNA-Expression von Sox-2 signifikant an, während die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant zurückging. Auf zellulärer Ebene wurde Hypoxie durch ein Wechselspiel des Sauerstoffsensors PHD und dem Hypoxie-induzierbaren Faktor Hif wahrgenommen. Speziell die relative mRNA-Expression der Isoform PHD3 stieg durch Kultivierung von hASCs unter Hypoxie (3% O₂) und in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) signifikant an. Dem gegenüber fiel die relative mRNA-Expression von Hif 1α unter gleichen Bedingungen signifikant ab. Dabei spielte es keine Rolle ob Hypoxie durch die Reduktion des Sauerstoffgehaltes auf 3% oder chemische Hypoxie mittels DFX verwendet wurde. Auch in Experimenten mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt durch H₂O₂ konnten vergleichbare Effekte erzielt werden. Im Allgemeinen registrieren Zellen den Kontakt untereinander durch Signalübertragungen vermittelt über Connexine. HASCs zeigten dahingehend eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression von GJA1, dem Gen für das Connexin 43, wenn diese Zellen in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) und unter

hypoxischen Bedingungen (3% O₂) kultiviert wurden. Den gleichen tendenziellen Verlauf zeigte die Proteinexpression von Cx43.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten aus der vorliegenden Arbeit, dass isolierte hASCs durch Hypoxie, ROS und erhöhte Zelldichte entscheidend beeinflusst und diese Effekte möglicherweise durch die Faktoren PHD3, Hif 1 α und Cx43 vermittelt werden.

3 Einleitung

3.1 Embryonale Stammzellen

Humane embryonale Stammzellen (*Human Embryonic Stem Cells, hESC*) werden für *in vitro*-Experimente aus dem Embryoblast der befruchteten Eizelle im Entwicklungsstadium der Blastozyste gewonnen (Thomson et al. 1998). Entscheidende Charakteristika embryonaler Stammzellen sind die prolongierte Proliferation ohne Differenzierung, die Herkunft aus präimplantierten Embryonen und das Potential in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) zu differenzieren (Pluripotenz) (De Paepe et al. 2014, Thomson et al. 1998). Embryonale Stammzellen wurden erstmals 1981 aus Blastozysten der Maus (Evans und Kaufman 1981) und 1998 in den USA erstmals aus menschlichen Blastozysten (Thomson et al. 1998) isoliert. Die wissenschaftliche Arbeit mit menschlichen embryonalen Stammzellen ist allerdings aus ethischen, politischen, biologischen und regulatorischen Gründen limitiert (Harris 2009). Laut dem Embryonenschutzgesetzes vom 1. November 2012 ist es in Deutschland nicht erlaubt, menschliche Embryonen für wissenschaftliche Zwecke zu nutzen.

Aus diesem Grund und mit Option der autologen Stammzelltherapie wurde versucht Stammzellen zu induzieren. Induzierte pluripotente Stammzellen (*Induced Pluripotent Stem Cells, iPS*) sind Stammzellen, die aus somatischen Zellen beispielsweise mittels lentiviraler Transfektion mit embryonalen Transkriptionsfaktoren erzeugt werden und die gleichen Eigenschaften wie embryonale Stammzellen aufweisen. 2007 wurden erstmals durch Takahashi et al. iPS aus humanen Fibroblasten durch lentivirale Transfektion mit Oct3/4, Sox-2, c-Myc und Klf-4 hergestellt (Takahashi et al. 2007). Hierdurch wird die Bedeutung von Oct3/4, Sox-2 und NANOG als Pluripotenzfaktoren veranschaulicht.

3.2 Adulte mesenchymale Stammzellen

Humane adulte mesenchymale Stammzellen (*Human Mesenchymal Stem Cells, hMSC*) sind multipotente Stammzellen, die in nicht-hämatopoetisches Gewebe differenzieren können. HMCS wurden vor über 140 Jahren erstmals von Cohnheim beschrieben (Cohnheim 1867). Diese Zellen kommen vorwiegend im Knochenmark vor (Tuli et al. 2003), konnten aber auch im Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Nabelschnurblut (Erices et al. 2000) und der Zahnpulpa (Govindasamy et al. 2010) nachgewiesen werden. Die *International Society of Cellular Therapy (ISCT)* definierte Kriterien zur

Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen: Hierzu zählen die Plastikadhärenz, spezifische Oberflächenantigene und das multiple Differenzierungspotential (Dominici et al. 2006).

3.3 Human Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASCs)

Human Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASCs) sind humane, vom Fettgewebe abgeleitete, mesenchymale Stammzellen. Ihre Existenz wurde erstmals 2001 durch Zuk et al. beschrieben (Zuk et al. 2001). Es existieren zahlreiche unterschiedliche Bezeichnungen für diese Zellen. In Anlehnung an die Nomenklatur der „*International Fat Applied Technology Society*“ wurde der Begriff *Human Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASCs)* etabliert.

HASCs liegen nach der Isolation in einer sogenannten *Stromal Vascular Fraction (SVF)* vor. Diese heterogene Zellpopulation enthält vaskuläre Zellen, reife Adipozyten sowie fibroblastenähnliche mesenchymalen Stammzellen, welche in verschiedene Zelllinien differenzieren können (Gimble et al. 2007, Madonna et al. 2009, Zuk et al. 2002). Diese fibroblastenähnlichen Zellen zeigen *in vitro* eine spindelförmige und plastikadhärente Morphologie (Witkowska-Zimny und Walenko 2011) (Abb. 1). Eine hohe Proliferationsrate ermöglicht eine rasche Vervielfältigung der Zellen (Yang et al.).

3.3.1 Bedeutung von hASCs in der Regenerativen Medizin

Die regenerative Medizin, mit dem Ziel der Entwicklung stammzellbasierter Therapieformen zum Ersatz geschädigten Gewebes (*tissue engineering*) spielt vor allem im Hinblick auf die hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten von kardiovaskulären Erkrankungen in den Industrieländern von einer zunehmenden Rolle (Haque et al. 2013, Sharma und Raghubir 2007). Adulte Stammzellen aus dem Fettgewebe erfüllen in ausreichendem Maße grundlegende Bedingungen, um für den therapeutischen Einsatz in der regenerativen Medizin geeignet zu sein: Die Stammzellausbeute von hASCs ist signifikant höher als in anderen Geweben (De Ugarte et al. 2003, Fraser et al. 2006, Griesche et al.), subkutanes Fettgewebe kann bei operativen Routineeingriffen oder bei minimal invasiven Fettabsaugungen, meist verbunden mit geringem Patientenrisiko, gewonnen werden (Parker und Katz 2006, Strem et al. 2005, Zuk et al. 2001), hASCs zeigen eine nach reproduzierbaren Protokollen beeinflussbare multipotente *in vitro*-Differenzierung (Ramkisoensing et al. 2011, Strem et al. 2005, Zuk et al. 2002) und können autolog transplantiert werden (Ascheim et al. 2014).

3.3.2 Oberflächenmarker

Die Immunophenotypen von hASCs und mesenchymalen Stammzellen sind zu über 90% identisch (Zuk et al. 2002). Das Expressionsprofil ändert sich allerdings in Abhängigkeit von Passage und Plastikadhärenz (McIntosh et al. 2006, Mitchell et al. 2006). Nach zwei oder mehr Passagen in Kultur exprimieren hASCs typische mesenchymale Oberflächenmarker wie CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, und CD166 (Gimble et al. 2007, Mitchell et al. 2006, Strem et al. 2005). Diese Oberflächenantigene fungieren unter anderem als Adhäsions- und Rezeptormoleküle im Rahmen der Zellmigration, Zellproliferation oder Zellinteraktion (Lange et al. 2005) (Tab. 1). Charakteristische Oberflächenmarker von hämatopoetischen Stammzellen (*Human Hematopoietic Stem Cells, hHSCs*) wie CD133 und endothelialen Vorläuferzellen wie CD31 und CD34 sind nicht nachzuweisen (Gimble et al. 2007, Gronthos et al. 2001).

	Oberflächenantigen	Funktion
Positiv	CD29 (β_1 -Integrin)	Adhäsionsmolekül
	CD44 (Hyaluronate)	Rezeptormolekül
	CD73 (5' Ecto-Nucleotidase)	Enzym
	CD90 (Thy1)	Extrazellulärmatrixmolekül
	CD105 (Endoglin)	Adhäsionsmolekül
	CD166 (ALCAM)	Adhäsionsmolekül
Negativ	CD31 (PECAM-1)	Hämatopoese
	CD34	Hämatopoese
	CD133 (PROM1)	Hämatopoese

Tab. 1: Immunophenotyp von hASCs. Modifiziert nach (Gimble et al. 2007).

3.3.3 Multipotentes Differenzierungspotential

HASCs sind multipotente Stammzellen und damit unter entsprechenden Bedingungen in der Lage *in vivo* und *in vitro* innerhalb der mesenchymalen und ektodermalen Stammzellreihe in Adipozyten (Scioli et al. 2014, Sen et al. 2001), Chondrozyten (Erickson et al. 2002), Osteozyten (Halvorsen et al. 2001), Myozyten (Mizuno et al. 2002) oder Neuronen (Safford et al. 2002) zu differenzieren (Abb. 1). Andere Studien weisen zudem eine Differenzierung von hASCs in Kardiomyozyten nach (Choi et al. 2010, van Dijk et al. 2008). Zelldifferenzierung und Gewebeumbau werden durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, IL-6 und TNF α vermittelt (Kilroy et al. 2007).

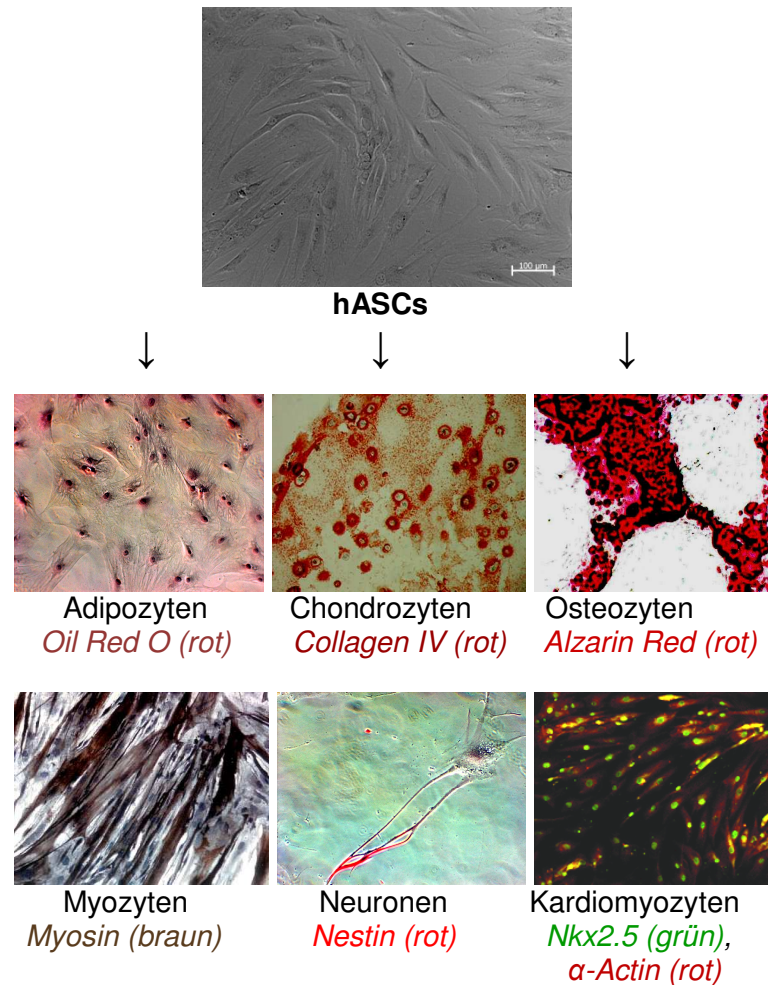


Abb. 1: **Multipotente Differenzierung von hASCs.** hASCs, Adipozyten, Neuronen: Labor für Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung, Chondrozyten: (Erickson et al. 2002), Osteozyten: (Halvorsen et al. 2001), Myozyten: (Mizuno et al. 2002), Kardiomyozyten: (Choi et al. 2010).

3.3.4 Embryonale Gene

Die Transkriptionsfaktoren NANOG, Sox-2, Oct3/4 und Rex-1 sind entscheidend an der Etablierung und dem Erhalt von undifferentierten embryonalen und pluripotenten Stammzellen beteiligt und werden deshalb als Pluripotenzfaktoren bezeichnet (Boyer et al. 2005). Die Herabregulation dieser Gene führt zur Differenzierung von Stammzellen (Boyer et al. 2005). Die alternative Bezeichnung als embryonale Gene resultiert aus ihrer Expression in der frühen Embryonalentwicklung.

NANOG, Sox-2 und Oct3/4 stehen über Autoregulation sowie positive und negative Rückkopplung miteinander in Verbindung (Boyer et al. 2005, Rizzino 2009). Durch positive Rückkopplung fördern NANOG, Sox-2 und Oct3/4 ihr Potential zur Pluripotenz und Selbsterneuerung (Boyer et al. 2005). Sie regulieren gemeinsam mehr als 353

identische Transkriptionsfaktoren, welche größtenteils wichtige konservierte Homöodomänen in hESCs darstellen. Dabei aktivieren sie entscheidende Zielgene für die Stammzellidentität und inaktivieren auf der anderen Seite Gene, welche für Entwicklung und Differenzierung bedeutend sind (Boyer et al. 2005, Rizzino 2009). Izadpanah et al. wiesen 2006 erstmals die Expression von Sox-2, Oct3/4 in hASCs nach (Izadpanah et al. 2006).

3.3.4.1 NANOG

NANOG ist ein Homöobox-Protein mit 305 Aminosäuren, dessen Gen auf dem Chromosom 12 kodiert wird. Der Name stammt von dem aus der keltischen Mythologie kommenden *Tir Nan Og*, „Land der ewigen Jugend“. In embryonalen Stammzellen ist NANOG hoch exprimiert und von entscheidender Bedeutung für Pluripotenz und Selbsterneuerung (Hart et al. 2004, Zaehres et al. 2005). Die Expression von NANOG in somatischen Stammzellen erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine suffiziente *in vitro* Reprogrammierung. NANOG beeinflusst wiederum andere Stammzellgene (Picanco-Castro et al.). Es ist unter anderem ein Transkriptionsaktivator für Rex-1 (Shi et al. 2006). Zudem wurde durch Rodda et al. eine transkriptionelle Regulation von NANOG durch Sox-2 und Oct3/4 beschrieben (Rodda et al. 2005).

3.3.4.2 Sox-2

Die geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (*Sex Determining Region Y (SRY)-Box 2*, Sox-2) ist ein Protein mit 317 Aminosäuren, dessen Gen auf dem Chromosom 3 liegt. Sox-2 ist ebenso ein wichtiger Transkriptionsfaktor zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen und besitzt hoch konservierte DNA-Bindedomänen, welche als *High Mobility Group* (HMG) bezeichnet werden (Rizzino 2009). Auch Sox-2 beeinflusst andere Stammzellgene (Rizzino 2009, Shi et al. 2006). Zudem konnte Sox-2 in neuronalen Stammzellen nachgewiesen werden (Ellis et al. 2004).

3.3.4.3 Oct3/4

Der Transkriptionsfaktor wird aufgrund seiner Bindung an Oktamer-Sequenzmotive als Oct bezeichnet. Oct3/4, welches auch als Oct-3, Oct4 oder Pou5f1 bezeichnet wird, ist das am weitesten verbreitete Oktamer-bindende Protein (Rizzino 2009). Oct3/4 ist ein Protein mit 360 Aminosäuren. Das Gen wird auf dem Chromosom 6 kodiert und gehört zur Pit-1, Oct-1, Oct-2, Unc-86 (POU)-Familie der Transkriptionsfaktoren (Rizzino 2009,

Rodda et al. 2005). Oct3/4 spielt eine wichtige Rolle für die normale Embryonalentwicklung, wird während der Differenzierung herunterreguliert (Reubinoff et al. 2000, Zaehres et al. 2005) und interagiert unter anderem mit Sox-2 bei der gemeinsamen Beeinflussung von anderen für die Entwicklung entscheidenden Transkriptionsfaktoren (Rizzino 2009).

3.3.5 Proliferationsmarker

3.3.5.1 Rex-1

Das Zinkfingerprotein Rex-1 besteht aus 310 Aminosäuren und wird über das Gen ZFP42 kodiert. Rex-1 ist ein wichtiger Marker für Pluripotenz und Proliferation von Stammzellen (Ben-Shushan et al. 1998). Es wird durch die Transkriptionsfaktoren NANOG und Sox-2 aktiviert (Shi et al. 2006) und durch Oct3/4 sowohl aktiviert als auch inhibiert (Ben-Shushan et al. 1998). Rex-1 konnte 2006 durch Izadpanah et al. in hASCs nachgewiesen werden (Izadpanah et al. 2006).

3.4 Hypoxie

Hypoxie bezeichnet die Mangelversorgung des Gewebes mit Sauerstoff (Connett et al. 1990). Im Rahmen von experimentellen Studien werden Gewebekulturen *in vitro* meist mit einem Sauerstoffanteil von ungefähr 20% kultiviert (Umgebungsluft entspricht 21% O₂). Allerdings herrscht in der natürlichen Zellumgebung *in vivo* eine geringere Sauerstoffkonzentration, da die mittlere Sauerstoffkonzentration im arteriellen Blut nur etwa 12% beträgt (Csete 2005). Der Normwert des Sauerstoffanteils in adultem Gewebe liegt abhängig von Alter, Geschlecht, Lokalisation des Gewebes und Grad der Vaskularisation zwischen 2 bis 9% (Simon und Keith 2008). In Gehirn, Nierenmark und in Knochenmarksnischen existieren Sauerstoffkonzentrationen von nur 1% (Mohyeldin et al. 2010, Simon und Keith 2008). Im Fettgewebe wurden Sauerstoffkonzentrationen von 3% nachgewiesen (Pasarica et al. 2009, Yin et al. 2009). Daher wird von einigen Autoren diese niedrigere Sauerstoffkonzentration auch als „physiologische Normoxie“ bezeichnet (Csete 2005, Simon und Keith 2008). Aus molekularer Sicht kann physiologische Normoxie allerdings als Hypoxie bezeichnet werden, da bei Sauerstoffkonzentrationen von 2 bis 9% hypoxiespezifische Effekte durch Hypoxie-induzierbare Faktoren nachzuweisen wurden (Mohyeldin et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Sauerstoffkonzentration auf niedrigere Werte *in vitro*

entscheidend die embryonale und adulte Stammzellbiologie beeinflusst (Eliasson und Jonsson 2010, Panchision 2009).

Die Embryonalentwicklung wird stark durch den Sauerstoffgradienten beeinflusst. Während der frühen Entwicklung des Embryos herrscht natürlicherweise eine niedrige Sauerstoffkonzentration von etwa 3 bis 5% (Rodesch et al. 1992), wobei noch niedrigere Sauerstoffkonzentrationen beschrieben wurden (Csete 2005). Zellen reagieren auf die hypoxische Umgebung mit der Stimulation von Hypoxie-induzierbaren Faktoren (Hif), welche daraufhin zur Bildung von Gefäßen, Blutzellen, der Plazenta und den Organsystemen führen. Außerdem bewohnen einige Stammzellen und Vorläuferzellen Nischen innerhalb hypoxischer Umgebungsbedingungen (Schofield 1978, Simon und Keith 2008, Vunjak-Novakovic und Scadden 2011). Stammzellnischen sind anatomische, zelluläre und nicht-zelluläre Komponenten enthaltende Kompartimente (Jones und Wagers 2008, Scadden 2006). Die zellulären und nicht-zellulären Komponenten von Stammzellnischen können dabei in vier Gruppen unterteilt werden: (1) die regulatorischen Moleküle wie Sauerstoff und Zytokine, (2) der Kontakt zu anderen Zellen über Zell-Zell-Kontakte, autokrine und parakrine Signalmoleküle, (3) die extrazelluläre Matrix zur Festigkeit und Immobilisation und (4) physikalische Faktoren, welche elektrische Signale vermitteln. Kontakt und Kommunikation zwischen diesen Elementen sind entscheidend für Zellerneuerung und Pluripotenz (Scadden 2006). Obwohl sich hMSCs in perivaskulären Nischen mit enger Beziehung zu Blutgefäßen befinden (Crisan et al. 2008), fanden sich in Stammzellen niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Harrison et al. 2002). Unter Hypoxie ist die Differenzierung von Stammzellen gehemmt. Dieser Effekt wird vermutlich durch Herunterregulation von für die Differenzierung verantwortlichen Genen durch Hif 1 α induziert (Yun et al. 2002). Embryonale Gene wurden hochreguliert (Simon und Keith 2008) und Proliferationsraten erhöht (Ezashi et al. 2005). Weitere Studien fanden heraus, dass Sauerstoffkonzentrationen, wie sie unter normoxischen Bedingungen *in vitro* zu finden sind, einen negativen Einfluss auf hMSC haben. Es kommt dabei zu vorzeitiger Alterung, verlängerter Proliferationszeit und DNA-Schäden (Estrada et al. 2012, Fehrer et al. 2007). Auf der anderen Seite konnten bei Sauerstoffkonzentrationen von unter 1% reduzierte Proliferationsraten in hMSCs (Holzwarth et al. 2010) und hESCs bei gleichbleibender Pluripotenz nachgewiesen werden (Ezashi et al. 2005).

3.4.1 Regulation durch die Hypoxie-induzierbaren Faktoren Hif 1 α , Hif 2 α und Hif 3 α

Im Zentrum der Anpassung an Hypoxie stehen die Heterodimere der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (Hif) (Masson und Ratcliffe 2003, Stamati et al. 2011, Wang et al. 1995). Die Isoform Hif 1 α wurde als erste charakterisiert und zählt zu den basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Domänen Transkriptionsfaktoren (Wang et al. 1995). Hif bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit (auch als *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT)* bezeichnet), welche gemeinsam einen funktionellen Transkriptionskomplex bilden. Während ARNT/Hif 1 β konstitutiv exprimiert wird und in den meisten Zelltypen unabhängig vom Oxygenierungszustand im Zellkern nachgewiesen werden konnte, stellt Hif 1 α die regulatorische Komponente des Transkriptionskomplexes dar. Hif 1 α wird in hypoxischen Zellen bei Sauerstoffkonzentrationen von unter 6% exponentiell erhöht exprimiert und in den meisten Zellen unter normaler Sauerstoffversorgung abgebaut (Semenza 2001, Wang et al. 1995). Hif 1 α wird ubiquitär exprimiert (Hu et al. 2003, Simon und Keith 2008). Die Expression von Hif 2 α wurde in Lunge, Niere, Leber, Herz und Endothelzellen beschrieben (Hu et al. 2003, Uchida et al. 2004). Zudem scheint Hif 2 α eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zu spielen (Franovic et al. 2009). In hESCs und Tumoren abgeleitet aus embryonalen Stammzellen wird Oct3/4 durch die Überexpression von Hif 2 α hochreguliert (Covello et al. 2006). Hif 3 α konnte in der Lunge sowie im zerebralen Kortex und dem Hippocampus nachgewiesen werden (Heidbreder et al. 2003). Hif 2 α und 3 α zählen auch zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS-Domänen Transkriptionsfaktoren (Gu et al. 2000). Während Hif 2 α und 3 α primär immer im Zellkern zu finden sind, befindet sich Hif 1 α unter Normoxie im Zytoplasma und wandert erst unter Hypoxie in den Zellkern (Kallio et al. 1998).

Unter normalen Sauerstoffbedingungen (Normoxie) ist die α -Untereinheit von Hif an den zwei spezifischen Prolylresten P-402 und P-564 in der Sauerstoff-abhängigen Degradationsdomäne (*Oxygen Dependant Degradation Domain, ODDD*) hydroxyliert (Masson et al. 2001, Metzen et al. 2003). Diese Reaktion wird über die *Prolyl Hydroxylase Domain Containing Protein (PHD)* 1, 2 und 3, auch bezeichnet als *Egg laying Defective Nine Homologue (EGLN)* 2, 1 und 3, katalysiert (Epstein et al. 2001). PHD1-3 sind Eisen enthaltende Dioxygenasen, welche für ihre enzymatische Tätigkeit molekularen Sauerstoff (O₂), 2-Oxoglutarat und Ferroeisen (Fe²⁺) benötigen

(Jewell et al. 2001). Das von Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor Protein führt anschließend über Ubiquitinylierung zum Abbau von Hif- α durch Proteasomen (Ivan et al. 2001, Jaakkola et al. 2001). *Factor Inhibiting Hif* (FIH/ *HIF1AN*), als ein weiterer Sauerstoffsensor, hydroxyliert den Asparaginrest an Position 803 und hemmt damit die Bindungsfähigkeit von Hif an den Koaktivator p300 (Lando et al. 2002, McNeill et al. 2002). Forristal et al. wiesen nach, dass unter normalen Sauerstoffbedingungen zwar die Aktivität von Hif 2 und 3 α , nicht aber von Hif 1 α reduziert ist (Forristal et al. 2010).

Unter Hypoxie ist diese Hydroxylierung gehemmt, sodass der stabile Transkriptionsfaktor Hif (Heterodimerisierung aus α - und β -Untereinheit) an die *Hypoxia-Response Elements* (HRE) der Promotorregionen von Genen zur Anpassung an die Sauerstoffminderversorgung binden kann (Semenza 2001, Wang et al. 1995) (Abb. 2).

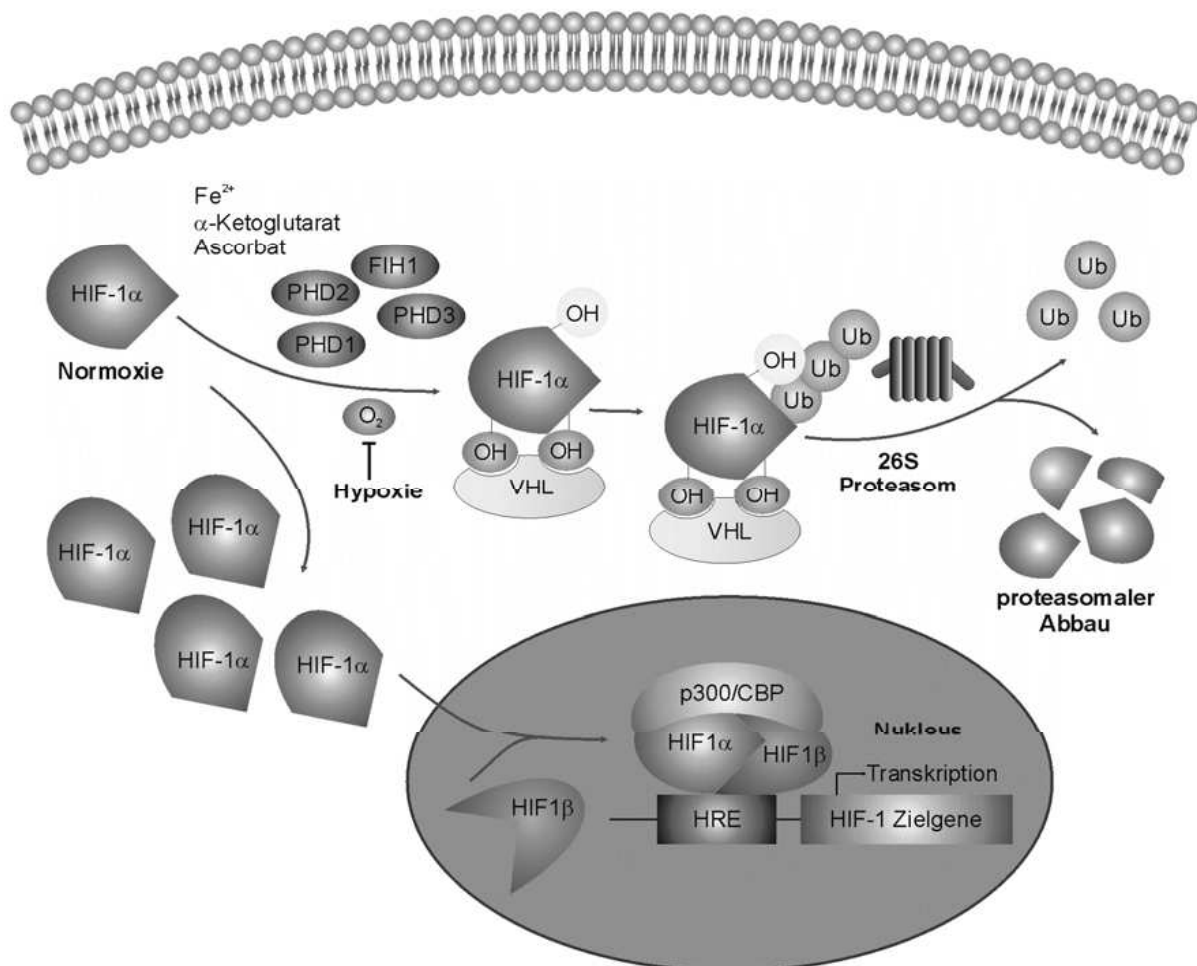


Abb. 2: **Regulation von Hif unter Normoxie und Hypoxie.** Modifiziert nach (Wagner 2006).

3.4.2 Die Prolyl Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 werden durch Hypoxie-induzierbare Faktoren (Hif) reguliert

Die Prolyl Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3 sowie HIF1AN (FIH) gehören zur Familie der Fe^{2+} - und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Fraisl et al. 2009). PHD1 wird nur im Zellkern, PHD2 vorwiegend im Zytoplasma und PHD3 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma exprimiert (Wagner 2006). Metzen et al. fanden zudem heraus, dass die mRNA-Expression von PHD2 und PHD3 durch Hypoxie induziert werden kann, während die mRNA-Expression von PHD1 und HIF1AN Sauerstoff-abhängig ist (Metzen et al. 2003). Einige Autoren schreiben PHD3 eine besondere Rolle während der Regulation der Hypoxie-induzierbaren Faktoren unter Hypoxie zu. Aprelikova et al. fanden beispielsweise 2004 heraus, dass die Expression von PHD3 im Gegensatz zu PHD1 und 2 mit der Expression von Hif-Zielgenen assoziiert ist. Zudem sank die Hypoxie-induzierte Expression von PHD3, wenn Hif 1 α und Hif 2 α herabreguliert wurden (Aprelikova et al. 2004). Pescador et al. zeigten an humanen Zervixkarzinomepithelzellen, dass die mRNA-Expression von PHD3 unter Hypoxie abhängig von Hif 1 α induziert wird. Hif 1 α bindet dabei an das *Hypoxia-Response Element (HRE)* der Promotor- und Enhancerregion des PHD3-Gens (Pescador et al. 2005). Vermutlich wird PHD3 in den meisten Zelltypen durch Hypoxie stark hochreguliert (Metzen et al. 2003). Die Hochregulierung von Prolyl Hydroxylasen unter Hypoxie dient vermutlich als negativer Feedback, um die Aktivität von Hif unter Hypoxie zu kontrollieren (D'Angelo et al. 2003).

3.4.3 Zielgene der Hypoxie-induzierbaren Faktoren (Hif)

Sauerstoff ist unverzichtbar zur Aufrechterhaltung elementarer Zellfunktionen. Zellen reagieren auf Hypoxie mit evolutionären Überlebensprogrammen, welche durch Genexpressionen vermittelt werden. Dadurch werden der Erhalt der Zellfunktion und die Wiederherstellung des Sauerstoffangebots sichergestellt. Die Zielgene der Hypoxie-induzierbaren Faktoren stimulieren unter anderem die Angiogenese und Erythropoese sowie den anaeroben Glukosestoffwechsels (Wagner 2006) (Tab. 1).

Zielgene	Funktion
Erythropoietin (Epo)	Erythropoese
<i>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</i> , <i>Endothelial Growth Factor (EGF)</i>	Angiogenese
<i>Nitric Oxide Synthase (NOS)</i> -2, adrenerger Rezeptor	Vaskulärer Tonus
Glukosetransporter (GLUT)-1, Gluceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)	Glukosestoffwechsel
Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrinrezeptor	Eisenstoffwechsel
<i>Insulin-Like-Growth Factor (IGF)</i> -2	Zellproliferation

Tab. 2: Zielgene von Hif. Modifiziert nach (Wagner 2006).

3.4.4 Einfluss von Hypoxie auf hASCs

Durch Reduzierung des die Zellen umgebenden Sauerstoffgehalts auf eine bestimmte Konzentration entsteht Hypoxie (Connett et al. 1990, Mohyeldin et al. 2010). Chemische Hypoxie wird unter anderem durch die spezifische Inhibierung der Prolyl Hydroxylasen PHD1-3 mittels Deferoxamin (DFX) erzeugt. Der Eisenchelator DFX bindet dabei Fe^{2+} (Fraisl et al. 2009). Die Regulation in hASCs erfolgt auch über Hypoxie-induzierbare Faktoren (Hif) (Liu et al. 2013). Hypoxie stimuliert hASCs zur Proliferation und Migration über Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Kim et al. 2012). Kim et al. nutzten hierzu Hypoxie von 2% Sauerstoffgehalt und fanden heraus, dass die Gene Oct4 und Rex-1 in hASCs unter Hypoxie hochreguliert wurden (Kim et al. 2012). Covello et al. wiesen nach, dass Hif 2 α , aber nicht Hif 1 α die Expression von Oct4 induziert (Covello et al. 2006). Die Generierung von ROS durch Hypoxie wird über die NADPH-Oxidase 4 (Nox4) vermittelt, welche sich in der Nähe der Mitochondrien in hASCs befindet (Kim et al. 2012).

3.5 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

3.5.1 Entstehung von ROS *in vivo*

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species, ROS*) sind Formen des Sauerstoffmoleküls, die für den Organismus potentiell schädlich sein und zu oxidativem Stress führen können (Allen und Balin 1989). Vertreter sind unter anderem das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Kamata und Hirata 1999). ROS entstehen in den Mitochondrien als Nebenprodukte der Zellatmung. Nacheinander geschaltete Redoxmoleküle bilden eine Elektronentransportkette, die am Ende durch oxidative Phosphorylierung zur ATP-Synthese führt

(Blasiak und Szaflik 2011, Kirkinezos und Moraes 2001) (Abb. 3). Daneben werden ROS auch direkt durch membranständige NADPH-Oxidasen produziert.

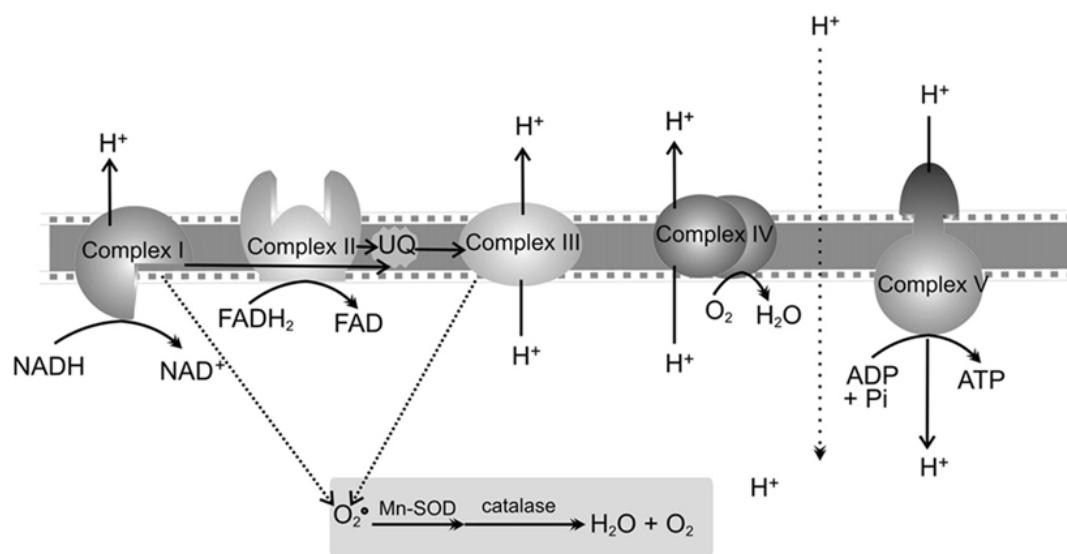


Abb. 3: **Atmungskette**. Modifiziert nach (Blasiak und Szaflik 2011).

3.5.2 Einfluss von ROS auf die Differenzierung von hASCs

Hohe Konzentrationen von ROS schädigen die Zelle durch DNA-Schädigung und Proteindenaturierung (Allen und Balin 1989). Im Gegensatz dazu können niedrige ROS Konzentrationen die Zellproliferation stimulieren und durch ihre Diffusionsfähigkeit und ihr ubiquitäres Vorkommen als ideale intrazelluläre Signalmoleküle dienen (Sauer et al. 2001). Birket et al. wiesen nach, dass eine Reduzierung von ROS in hESC abgeleiteten Kardiomyozyten zu vulnerableren Zellen hinsichtlich metabolischen Stress führt (Birket et al. 2013). Unter Hypoxie wird durch Hypoxie-induzierbare Faktoren (Hif) die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) stimuliert. Gebildetes Stickstoffmonoxid (NO) inhibiert die Cytochrom-c-Oxidase der Elektronentransportkette in den Mitochondrien. Eine reduzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist die Folge (Fraisl et al. 2009). Demgegenüber gibt es Daten, die postulieren, dass Mitochondrien in humanen hepatozellulären Karzinomzellen unter Hypoxie (1,5% O₂) durch die Produktion von ROS als primäre Sauerstoffsensoren dienen und auf diese Weise Hif-Proteine stabilisieren (Chandel et al. 1998, Hu et al. 2003). Kim et al. zeigten, wie bereits unter dem Punkt 1.4.4 beschrieben, dass die Generierung von ROS in hASCs unter Hypoxie durch die NADPH-Oxidase 4 (Nox4) vermittelt wird. Dieses Enzym befindet sich in der Nähe der Mitochondrien (Kim et al. 2012).

3.6 Zelldichte

3.6.1 *Gap junctions* zur Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten

Gap junctions sind intrazelluläre Kanäle, die durch Zusammenlagerungen von zwei Connexonen zweier benachbarter Zellen gebildet werden. Jedes Connexon besteht aus sechs Transmembranproteinen, den Connexinen, die sechseckförmig angeordnet sind und in ihrer Mitte eine Pore enthalten (Willecke et al. 1991). Elektronenmikroskopisch lässt sich im Gegensatz zu *tight junctions* eine Lücke (*gap*) zwischen den Zellmembranen erkennen (Abb. 4).

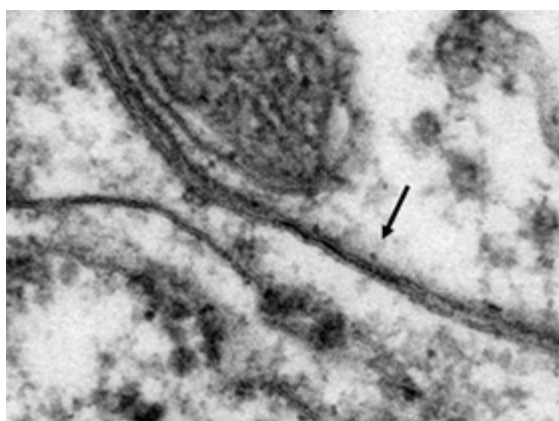


Abb. 4: **Gap junctions.** Modifiziert nach (Hughes et al. 2011).

3.6.2 Einfluss von *gap junctions* auf hASCs

Gap junctions dienen der chemischen und elektrischen Signalübertragung zwischen benachbarten Zellen. Dabei werden Ionen, Botenstoffe (*second messenger*) wie cAMP oder Stoffwechselmetabolite wie zum Beispiel Glukose ausgetauscht (Bruzzone et al. 1996). Sauer et al. wiesen 2011 eine spontane Ca^{2+} -Oszillation über *gap junctions* bei hASCs nach. Diese spontane Ca^{2+} -Oszillation kann durch Öffnen weiterer *gap junctions* mittels Inhibierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synchronisiert werden (Sauer et al. 2011). Die Permeabilität von *gap junctions* scheint also über NO reguliert zu werden (Bolanos und Medina 1996). Durch *gap junctions* werden diverse Zellprozesse wie Zellmigration, Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod reguliert (Bruzzone et al. 1996, Simon und Goodenough 1998). HESCs exprimieren zwei Proteine von *gap junctions*, Connexin 43 (Cx43) und Connexin 45 (Cx45). Die Bezeichnung setzt sich aus der Abkürzung für Connexine und der molekularen Masse des Proteins zusammen. Während Cx43 vorwiegend an der Zelloberfläche lokalisiert ist, befindet sich Cx45 mehr im Zytoplasma (Wong et al. 2004). *Gap junctions* wird zudem eine besondere Rolle im

Zellwachstum zugeschrieben. Es wird vermutet, dass eine Hochregulierung von *gap junctions* zu einer Inhibierung des Zellwachstums führt (Loewenstein und Rose 1992). Zudem scheinen *gap junctions* wichtig für das Überleben von hESCs zu sein, da eine Kultivierung von hESCs als einzelne Zellen zum Zelltod führte (Wong et al. 2004).

4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwieweit definierte Hypoxie und eine initial definierte Zelldichte Einfluss auf primär isolierte hASCs nehmen. Ziel war es daher, die Wirkung dieser beiden physiologischen Faktoren auf die Expression der Stammzellgene NANOG, Sox-2, und Oct3/4 sowie des Proliferationsmarkers Rex-1 zu erforschen. Voraussetzung hierfür war, isolierte hASCs aus den verwendeten Patientenproben über die Analyse von Oberflächenantigenen als mesenchymale Stammzellen zu charakterisieren. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss von definierter Hypoxie und Zelldichte auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. Zu diesem Zweck wurde speziell die relative mRNA-Expression der Gene des Hypoxie-induzierbaren Faktors Hif 1 α und der Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3) analysiert. Weiterhin wurde die relative mRNA-Expression und Aktivität von Connexin 43 bestimmt. Darüber hinaus sollten weitere physiologische Faktoren, welche in Zusammenhang mit Hypoxie und Zelldichte stehen, in ihrem Einfluss auf hASCs untersucht werden. Aus diesem Grund wurden Inkubationsversuche mit DFX zur Erzeugung chemischer Hypoxie und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als reaktive Sauerstoffspezies durchgeführt.

5 Material

5.1 Zelllinie

Subkutanes Fettgewebe von Patienten aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (MKG) des Universitätsklinikums Jena (UKJ) wurde im Rahmen von Routineeingriffen entfernt. Die hieraus isolierte Zelllinie bezeichnet humane fettabgeleitete mesenchymale Stammzellen (Tab. 3).

Zelllinie	Spezies	Herkunft	Spender	Stammzelllinie	Differenzierung
<i>Human Adipose Tissue Derived Stem Cells (hASC)</i>	Mensch	Subkutanes Fettgewebe	Patienten der MKG des UKJ	Mesenchymal	Multipotent

Tab. 3: Merkmale der verwendeten Zelllinie.

5.2 Patienten

HASCs wurden aus 17 verschiedenen Patienten (sieben weibliche und zehn männliche) isoliert und charakterisiert. Das mittlere Alter betrug $60 \pm 3,3$ Jahre ($n = 17$) und reichte von 32 bis 77 Jahren. Es wurde hauptsächlich Fettgewebe aus der Schulter oder dem Oberarm verwendet (Tab. 4). Die Entnahme wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität genehmigt (s. Ethikvotum).

hASCs aus Patientenproben	Herkunft Subkutanes Fettgewebe	Geschlecht	Alter [Jahre]
VI	Bauch	♂	67
VII	Brust	♀	36
VIII	Bauch	♀	32
IX	Schulter	♂	76
X	Schulter	♀	77
XI	Unterarm	♂	73
XII	Schulter	♂	55
XIII	Bauch	♀	62
XIV	Schulter	♀	51
XV	Schulter	♂	45
XVI	Oberarm	♂	59
XVII	Oberarm	♂	65
XVIII	Schulter	♀	77
XIX	Oberarm	♂	55
XX	Schulter	♂	59
XXI	Oberarm	♂	66
XXII	Oberarm	♀	70
MW	-	-	60
SEM	-	-	3,3

Tab. 4: Kenndaten zu verwendeten hASCs aus Patientenproben.

5.3 Substanzen

5.3.1 Primer

Es wurden humane Primer zum Nachweis spezifischer Gene verwendet (Tab. 5). Die Anneling-Temperatur (T_a) und die Zahl der Zyklen wurden in Vorversuchen bestimmt. Die Primer wurden vorher auf Kreuzreaktivität überprüft.

Gen	Spezies	Nukleotidsequenz 5' → 3' <i>fw: forward</i> <i>rv: reverse</i>	Produkt -länge [bp]	T _a [°C]	Zyklen
GUSB	Mensch	<i>fw</i> : AAACGATTGCAGGGTTTCAC <i>rv</i> : CTCTCGTCGGTGACTGTTCA	171	60	39
NANOG		<i>fw</i> : GATTTGTGGGCCTGAAGAAA <i>rv</i> : AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG	155		40
Sox-2		<i>fw</i> : ACACCAATCCCATCCACACT <i>rv</i> : GCAAACCTTCCTGCAAAGCTC	224		42
Oct3/4		<i>fw</i> : CTGAGGGCGAAGCAGGAG <i>rv</i> : AATAGAACCCCAGGGTGAG	241		38
Rex-1		<i>fw</i> : TGAAAGCCCACATCCTAACG <i>rv</i> : CAAGCTATCCTCCTGCTTTGG	554		34
PHD1		<i>fw</i> : CGTCCTGTTCTCCGGCCACCCT <i>rv</i> : CCTGCCCGCCAAAACCGTCC	498		38
PHD2		<i>fw</i> : TCAATGGCCGGACGAAAGCCA <i>rv</i> : GGTTGCGACGGTCAGACCAGA	243		38
PHD3		<i>fw</i> : CGTGGAGCTCCGCACCACTC <i>rv</i> : GCCCGCAGAATCGAGGTCCG	223		38
HIF1AN		<i>fw</i> : GCAGCCCACCTTGGCTCTTCC <i>rv</i> : GGCGAGACGCAGCCCCATTT	218		38
HIF-1α		<i>fw</i> : CTTTGCTGGCCCAGCCGC <i>rv</i> : TGGCTTTGGCGTTTCAGCGGT	191		40

Tab. 5: Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer.

5.3.2 Antikörper

Es wurden primäre und sekundäre Antikörper zur Darstellung von spezifischen Antigenen mittels Durchflusszytometrie (FACS), Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB) verwendet (Tab. 6). Die Verdünnung wurde in Vorversuchen bestimmt.

Primärer Antikörper				
Spezifität	Isotyp	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
CD29	Maus IgG	FACS	1:100	Millipore, Schwalbach, D
CD44	Maus IgG	FACS	1:500	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD90	Maus IgG	FACS	1:150	Millipore, Schwalbach, D
CD133	Maus IgG	FACS	1:500	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
NANOG	Kaninchen IgG	IHC	1:100	Kamiya Biomedical Company, Seattle, USA
Sox-2	Kaninchen IgG	IHC	1:100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oct3/4	Maus IgG	IHC	1:50	Santa Cruz, Heidelberg, D
HIF-1 α	Maus IgG	IHC/WB	1:100/1:300	Novus Biologicals, Cambridge, UK
HIF-2 α	Maus IgG	IHC/WB	1:100/1:500	GeneTex, Irvine, USA
Cx43	Maus IgG	IHC/WB	1:100/1:300	BD Biosciences, Heidelberg, D
GAPDH	Kaninchen IgG	WB	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärer Antikörper				
Spezifität	Isotyp	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Maus IgG	Cy3	IHC/FACS	1:100/1:500	Millipore, Schwalbach, D
Kaninchen IgG	Cy3	IHC	1:100	Millipore, Schwalbach, D
Maus IgG	Cy5	IHC	1:100	Millipore, Schwalbach, D
Maus IgG	HRP	WB	1:500	Santa Cruz, Heidelberg, D
Kaninchen IgG	HRP	WB	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg, D

Tab. 6: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper und deren Einsatz in Durchflusszytometrie (FACS), Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB).

5.4 Chemikalien

Anwendung	Chemikalie	Hersteller
Zellkultur/ Inkubationen	Deferoxamin-Mesylat (DFX)	Mayne Pharma, Salisbury, Australien
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, D
	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Invitrogen, Karlsruhe, D
	<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i> , sterilfiltriert	Sigma-Aldrich, München, D
	Gelatinelösung 0,1%	Sigma-Aldrich, München, D
	L-Glutamin 200mM	Biochrom, Berlin, D
	<i>Non Essential Amino Acids (NEAA)</i>	Biochrom, Berlin, D
	Penicillin/ Streptavidin (10mg/ml)	Biochrom, Berlin, D
	Trypsin/ EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Analyse der mRNA-Expression	Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
	β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, D
	DNA Hyperladder IV (100-1000 bp)	Bioline, Berlin, D
	DNase I Reaktionspuffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
	DNase I, RNase frei	Invitrogen, Karlsruhe, D
	dNTP-Mix [10 mM]	Invitrogen, Karlsruhe, D
	DTT [0,1 M]	Invitrogen, Karlsruhe, D
	EDTA [25 mM]	Invitrogen, Karlsruhe, D
	Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, D
	First Strand Puffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe, D
	M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
	Randomprimer (250ng/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
	REDLoadTaqMaster	Jena Bioscience, Jena, D
	<i>RNAeasy Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, D
	Rotor Gene SYBRGreen PCR Kit	Qiagen, Hilden, D
Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot	Acrylamid	Sigma-Aldrich, München, D
	Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, D
	Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, D
	Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
	Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, München, D

	Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, D
	ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Berlin, D
	Leupeptin	Sigma-Aldrich, München, D
	Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, D
	Pepstatin A	Sigma-Aldrich, München, D
	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, D
	Phosphat Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, München, D
	Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran	GE Healthcare, Berlin, D
	Precision Plus Protein Standards Marker	Bio-Rad, München, D
	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, D
	Sodium Orthovanadate (SOV)	Sigma-Aldrich, München, D
	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, D
	Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, D
	Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, D
	Tween	Merck, Darmstadt, D
Analyse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie	Dihydrochlorid (DAPI)	Invitrogen, Karlsruhe, D
	Ethidium-Homodimer 2 (EthD-2)	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Methanol/Aceton 7:3	Carl Roth, Karlsruhe, D
	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	GE Healthcare, Berlin, D
	Triton	Sigma-Aldrich, München, D

Tab. 7: Verwendete Chemikalien und deren Anwendung.

5.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Kryoröhrchen	Simport, Beloeil, Kanada
Multiwellplatten (6-, 12-, 24,-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (0,5, 1, 1,5, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (5, 12, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zellkulturflaschen <i>Monolayer</i> (25, 75 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Tab. 8: Verwendeten Verbrauchsmaterialien.

5.6 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
ApoTome	Carl Zeiss, Jena, D
Axiovert 40	Carl Zeiss, Jena, D
BD FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Biometra® UNO II	Biometra, Göttingen, D
cLSM 510 META	Carl Zeiss, Jena, D
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, D
HERAcell® 240	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
HERAsafe® KSP Class II	Thermo Scientific, Karlsruhe, D
LAS-3000	Fujifilm, Düsseldorf, D
Mini Protean Tetra Cell	Bio-Rad, München, D
Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, München, D
NanoDrop® ND-1000	Peqlap Biotechnologie, Erlangen, D
PowerPac Basic	Bio-Rad, München, D
Rotor-Gene® Q	Qiagen, Hilden, D
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS	Bandelin Electronic GmbH, Berlin, D

Tab. 9: Verwendete Laborgeräte.

5.7 Software

Software	Hersteller
AxioVision	Carl Zeiss, Jena, D
Gene Tools, Gene Snap	Syngene, Cambridge, UK
GraphPad InStat-3	GraphPad Software, La Jolla, USA
LSM 510	Carl Zeiss, Jena, D
LAS Software	Fujifilm, Düsseldorf, D
Rotor Gene Q Series	Qiagen, Karlsruhe, D
Quantity One	Bio-Rad, München, D

Tab. 10: Verwendete Software.

6 Methoden

6.1 Zellisolation

In Zusammenarbeit mit der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Jena wurde im Rahmen von elektiven Operationen, nach vorheriger Bewilligung durch die Ethikkommission der Universität Jena, subkutanes Fettgewebe aus unterschiedlichen Körperregionen entnommen. Aus ca. 50 g operativ entferntem Fettgewebe erfolgte die Isolation von humanen fettabgeleiteten Stammzellen (*Human Adipose Tissue Derived Stem Cells, hASCs*) nach dem Protokoll von Zuk et al. (Zuk et al. 2001). Das zerkleinerte Fettgewebe wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS und Zugabe von 2 mg/ml Kollagenase zum enzymatischen Verdau der extrazellulären Matrix (EZM), feinpräpariert. Durch Inkubation mit 160 mM Ammoniumchlorid (NH_4Cl) wurden die roten Blutzellen lysiert. Nach Filtration und Zentrifugation blieb als Sediment die sogenannte *Stromal Vascular Fraction (SVF)*. Diese wurde zunächst mit DMEM-Medium auf 6-Well-Platten ausplattiert. Die Separation der adhärennten hASCs als Subpopulation der SVF erfolgte durch Waschen und Mediumwechsel (Abb. 5).

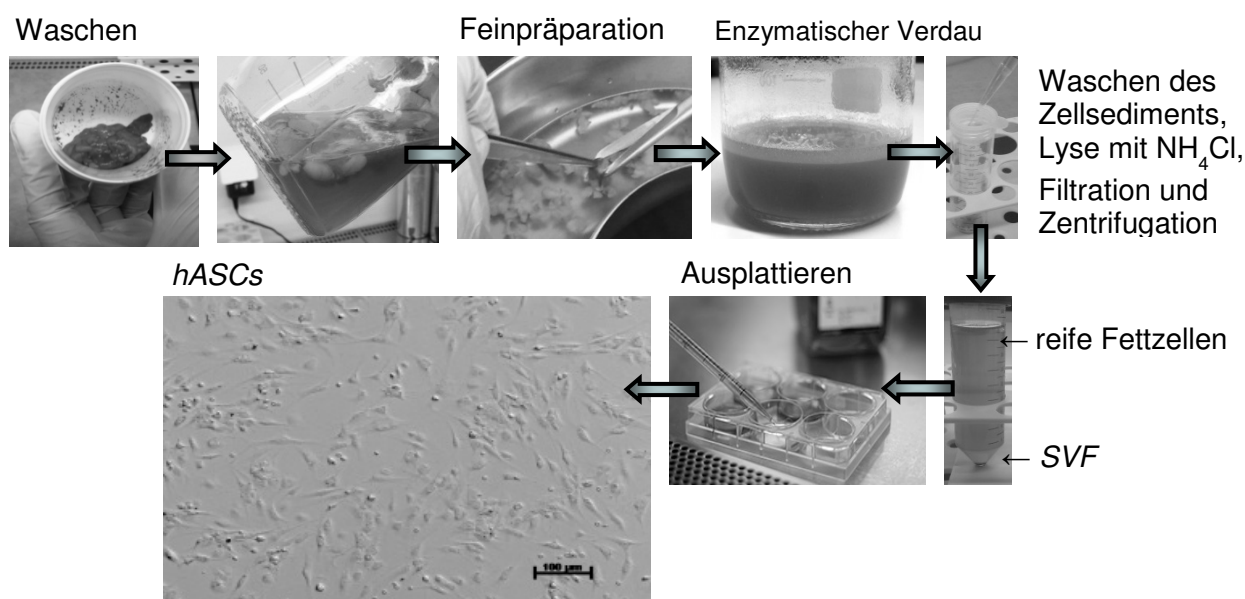


Abb. 5: **Isolation von humanen ASCs.** Modifiziert nach (Zuk et al. 2001). Bilder: Labor für Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung.

6.2 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte direkt nach der Isolation auf gelatinisierten 6-Well-Platten und bei entsprechender Konfluenz auf Zellkulturflaschen im Zellkulturinkubator bei einer Temperatur von 37°C, einem O₂-Gehalt von 21%, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Als Medium wurde DMEM mit Zusatz von Kalbsserum, Glutamin, nicht-essentiellen Aminosäuren, Penicillin und Streptomycin verwendet. Das benutzte Medium wurde unter standardisierten und sterilen Bedingungen alle zwei Tage gewechselt. Dem DMEM-Medium wurde für den Inkubationsversuch mit Wasserstoffperoxid 250 nM H₂O₂ zugesetzt und jeden Tag gewechselt und erneut hinzugegeben. Bei einer Konfluenz von etwa 80% wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und anschließend passagiert oder eingefroren. Für die Versuche wurden die Passagen drei bis zwölf verwendet. Die Zellen wurden in drei verschiedenen, jeweils um den Faktor vier steigenden Zelldichten (4.000, 15.000 und 60.000 Zellen pro ml) kultiviert (Abb. 6). Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin entsprechend im Labor etablierter Protokolle von der Zellkulturflasche gelöst, in einem Falcon zentrifugiert und in 10 ml Medium resuspendiert. Mithilfe einer Thomakammer wurde unter dem Mikroskop die Konzentration der hASCs in 10 ml Medium bestimmt, die Konzentrationen von 20.000, 75.000 und 300.000 Zellen pro 5 ml Medium berechnet und die Zellen auf je einem Well einer 6-Well-Platte ausplattiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass immer das gleiche Volumen von 5 ml verwendet wurde, um gleiche O₂-Partialdrücke zu garantieren. Zur Vereinfachung und besseren Darstellbarkeit wurden die Konzentrationen auf 1 ml Medium umgerechnet. Hieraus ergaben sich 4.000, 15.000 und 60.000 Zellen pro ml jeweils für die niedrige, mittlere und hohe Zelldichte.

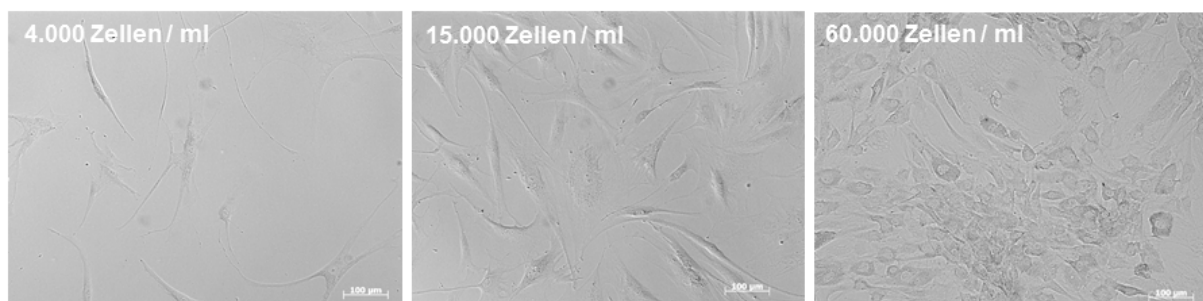


Abb. 6: **Kultivierung in 3 verschiedenen Zelldichten.** hASC XII Passage 5, nach 3 Tagen Kultivierung. Bilder: Labor für Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung.

Zur Kultivierung unter Hypoxie durch Erniedrigung des Sauerstoffgehalts wurde im Zellkulturinkubator HERAcell® 240, über das Prinzip der Gasverdrängung durch Insufflation von molekularem Stickstoff, der atmosphärische Sauerstoffgehalt auf 3% O₂ reduziert. Bei 18% N₂, 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C wurden die Zellen auf 6-Well-Platten drei Tage kultiviert. Durch den Zusatz von 200 µM Deferoxamin-Mesylat (DFX) als spezifischen Inhibitor der sauerstoffabhängigen Prolyl Hydroxylasen PHD1, PHD2 und PHD3, wurde chemische Hypoxie erzeugt.

6.3 Analyse von Oberflächenmarkern

6.3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescenc Activated Cell Sorting, FACS*) dient dem Zählen von Zellen anhand der Fluoreszenzmarkierung. Nach dem Ablösen der Zellen unter standardisierten Bedingungen mit 4 ml Trypsin von der Zellkulturflasche, folgte die Inkubation des primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung in 100 µl FACS-Puffer für 30 Minuten. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper in analoger Weise im Dunkeln inkubiert. Negativkontrolle und sekundäre Antikörperkontrolle wurden mitgefärbt.

6.3.2 Detektion der Immunfluoreszenz

Die Detektion positiv markierter Zellen über Fluoreszenzsignale erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers BD FACSCalibur der Firma BD Biosciences. In FACS-Röhrchen mit 300 µl FACS-Puffer wurden etwa 500 Zellen pro Sekunde und insgesamt 6500 Zellen gezählt.

6.4 Analyse der Proteinexpression mittels Immunhistochemie (IHC)

6.4.1 Färbung

Nach Abwaschen des Mediums wurden die Zellen zunächst mit 4% PFA eine Stunde bei 4°C fixiert. Die Permeabilisierung der Zellmembran zum Nachweis intrazellulärer Antigene erfolgte mit 350 µl 1% PBS-Triton 20 Minuten bei 4°C. Freie Bindungsstellen wurden mit einer Milchlösung eine Stunde bei 4°C geblockt. Der primäre Antikörper wurde in entsprechender Verdünnung in Milchlösung auf die Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Inkubation des sekundären Antikörpers sowie des Zellkernmarkers Dihydrochlorid (DAPI) erfolgte eine Stunde

bei 4°C. Zwischen allen Schritten wurden die Zellen jeweils dreimal mit 0,01% PBS-Triton gewaschen. Negativkontrolle und sekundäre Antikörperkontrolle wurden mitgefärbt.

6.4.2 Detektion der Immunfluoreszenz

Beim konfokalen *Laser Scanning Microscope (cLSM)* wird ein Laserstrahl mit definierter Wellenlänge über das Objektiv in der Probe fokussiert und durch zwei Scanner in x- und y-Richtung abgelenkt. Am cLSM 510 META der Firma Carl Zeiss wurden folgende Filtereinstellungen verwendet:

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum [nm]	Anregung	Emissionsfilter
Cy5	633	5 mW Helium/Neon-Laser	LP 650
DAPI	488	Argon-Laser	BP 420-480

Tab. 24: Filtereinstellungen am LSM510.

Die Bilder wurden mit einem 40x und 20x Objektiv aufgenommen.

6.5 Analyse der mRNA-Expression

6.5.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen nach Herstelleranweisungen. Um ausreichend RNA zu erhalten, wurde Zellmaterial einer konfluent gewachsenen Zellkulturflasche (5×10^6 Zellen) eingesetzt. Die RNA wurde mithilfe eines Zellysepuffers gewonnen, in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten über eine Isolationssäule gereinigt und mit 25 µl RNase freiem Wasser aus der Membran der Säule eluiert.

6.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA erfolgte mit dem Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000. Hierbei wurde 1 µl der Probe auf den Probenhalter aufgetragen, die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, gemessen und die Konzentration der RNA nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt berechnet:

$$c = OD_{260nm} \times 40$$

Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gibt die Reinheit der isolierten RNA an und sollte ungefähr zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

6.5.3 cDNA Synthese

Die Umschreibung der isolierten RNA in eine komplementäre DNA (*complementary DNA*, *cDNA*) erfolgte durch reverse Transkription entsprechend im Labor etablierter Verfahren. Es wurden je nach Versuchsansatz 0,4 µg oder 1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl RNA-Lösung angesetzt.

Reagenz	Volumen pro Probe [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
DNase I	1	RT	15
DNase I Reaktionspuffer (10x)	1		

Tab. 11: Reaktionsansatz zum DNA-Verdau.

Die Proben wurden zum DNA-Verdau mit dem Enzym DNase I versetzt, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern.

Reagenz	Volumen pro Probe [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
25 mM EDTA	1	65	5
Randomprimer (250ng/µl)	1		
10 mM dNTP-Mix	1		

Tab. 12: Reaktionsansatz zur Synthese des komplementären DNA-Erststranges.

Die enzymatische Aktivität der DNase I wurde durch Zugabe von EDTA gestoppt. Durch Erhitzen des Reaktionsansatzes erfolgte eine Denaturierung der RNA, gefolgt von der Synthese eines komplementären DNA-Erststranges durch Zugabe des Randomprimers und der Nukleotidtriphosphate.

Reagenz	Volumen pro Probe [μl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
First Strand Puffer (5x)	4	25	2
0,1 M DTT	2		
RNase freies Wasser	1		

Tab. 13: Reaktionsansatz zur Stabilisierung der RNA.

Nach Stabilisierung der RNA mittels Dithiothreitol (DTT), wurde zu jeder Probe je 1 μl der M-MLV Reversen Transkriptase gegeben. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine modifizierte *Moloney Murine Leukemia Virus* Reverse Transkriptase mit erhöhter Thermostabilität, wodurch die Amplifikation von längeren Transkripten möglich ist. Die Umschreibung erfolgte unter folgendem Temperaturgradienten:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Anlagerung	25	10
Synthese	37	50
Denaturierung	70	15

Tab. 14: Reaktionsbedingungen zur reversen Transkription.

Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

6.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) dient der Amplifizierung ausgewählter Genabschnitte der cDNA. Als *Kit* wurde der REDLoadTaqMaster der Firma Jena Bioscience verwendet. Dieser enthält die TaqPolymerase, die Enzysubstrate (dNTP), Reaktions- und Gelladepuffer, einen Stabilisator und roten Farbstoff.

Reagenz	Volumen pro Probe [μl]
REDLoadTaqMaster	5
Primer forward	1
Primer reverse	1
RNase freies Wasser	17
cDNA	1

Tab. 15: Reaktionsansatz zur PCR.

Eine Negativkontrolle zur Reinheitskontrolle wurde mitgeführt. Die Amplifizierung erfolgte im Eppendorf Mastercycler gradient unter folgendem Temperaturgradienten:

	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
	Erstdenaturierung	94	2 min
Primer spezifische Anzahl von Zyklen	Denaturierung	94	30 s
	<i>Annealing</i>	60	30 s
	Elongation	72	30 s
	Elongation	72	5 min

Tab. 16: Reaktionsbedingungen zur PCR.

Die spezifische *Annealing*-Temperatur (T_a) betrug bei allen Primern 60°C.

6.5.5 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte auf einem zweiprozentigen Agarosegel, welches zum Sichtbarmachen der Banden im UV-Licht mit dem zwischen den DNA-Strängen interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid versetzt war. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Es wurden 10 μl je Probe inklusive Negativkontrolle in eine Tasche gegeben und zur Interpretation der Größe des DNA-Fragmentes 5 μl des DNA-Längenstandards Hyperladder IV verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Laufzeit von etwa eine Stunde in der Gelelektrophoresekammer. Die Banden wurden unter UV-Licht detektiert und durch Messung der Intensität mithilfe des Programms GeneTools quantifiziert. Hierbei wurden identische Flächenbegrenzungen um die Banden definiert. Zur Auswertung wurden die gemessenen Werte auf das Haushaltsgen (*housekeeping gene*) GUSB sowie die embryonale Stammzellreihe H9 bezogen.

6.5.6 Real-Time PCR

Mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (*real-time* PCR) wurde kontinuierlich nach jedem einzelnen Zyklus die Anzahl der neu gebildeten DNA-Fragmente über Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Menge der amplifizierten DNA-Abschnitte. Als interkalierender Farbstoff wurde SYBRGreen verwendet. Die Amplifizierung erfolgt mit dem SYBRGreen PCR-Kit der Firma Qiagen.

Reagenz	Volumen pro Probe [μl]
SYBRGreen	10
Primer forward	1
Primer reverse	1
RNase freies Wasser	7
cDNA	1

Tab. 17: Reaktionsansatz zur *real-time* PCR.

Eine Negativkontrolle wurde mitgeführt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte im Rotor-Gene® Q unter folgenden Reaktionsbedingungen:

	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
	Erstdenaturierung	94	5 min
40 Zyklen	Denaturierung	94	10 s
	<i>Annealing</i>	60	30 s
	Elongation	72	1 min
	Elongation	72	2 min

Tab. 18: Reaktionsbedingungen zur *real time* PCR.

Über die Schmelzpunktanalyse wurde die Reinheit der amplifizierten Produkte überprüft. Bei allen Primern wurde eine *Annealing*-Temperatur (T_a) von 60°C genutzt. Die Quantifizierung erfolgte mit der Software Rotor Gene Q Series anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale. Hierbei wurde in der exponentiellen Phase der Amplifikation ein Schwellenwert (*threshold*) von 0,2 festgelegt. Der Schnittpunkt bezeichnet die Anzahl der Zyklen, nach denen der Schwellenwert der Fluoreszenz überschritten wird (*threshold cycle*, C_T -Wert). Zur Auswertung der Daten wurde die

Delta Delta C_T- Methode ($\Delta\Delta C_T$) nach Livak und Schmittgen angewandt (Schmittgen und Livak 2008). Auch bei der Echtzeit-PCR wurden zur Auswertung die gemessenen Werte auf das Haushaltsgen (*housekeeping gene*) GUSB sowie die embryonale Stammzellreihe H9 bezogen.

6.6 Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot

6.6.1 Proteinisolation

Die Arbeit mit Proteinen erfolgte stets auf Eis und mit gekühlten Reagenzien. Um ausreichende Proteinmengen zu erhalten, wurde das Zellmaterial aus konfluent gewachsenen hASCs einer Zellkulturflasche (5×10^6 Zellen) verwendet. Nach dem Waschen mit kaltem 1x PBS wurden die Zellen mit 100 μ l Homogenisationspuffer, welcher mit Proteasen- und Phosphataseninhibitoren zum Schutz der Proteine vor Abbau versetzt ist, homogenisiert.

Reagenz	Homogenisationspuffer
20mM Tris-HCl, pH 7,5	100 μ l
1% Triton X-100	500 μ l
1mM EDTA	10 μ l
H ₂ O	4,2 ml
1mM DTT	5 μ l
1mM PMSF	50 μ l
10 μ g/ml Aprotinin	5 μ l
5 μ g/ml Pepstatin A	50 μ l
25 μ g/ml Leupeptin	25 μ l
1mM SOV	0,92 mg
1% PIC	50 μ l

Tab. 19: Ansatz des Homogenisationspuffers.

Mittels Ultraschal (30 s, 2 Zyklen, 40% Leistung) wurde die Zell- und Kernmembran mechanisch lysiert und zur Reinigung von Zelltrümmern das Lysat bei 4°C und 8400 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Die Lagerung der isolierten Proteine erfolgte bei -80°C.

6.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der photometrischen Methode nach Bradford (Bradford 1976). Der Trimethylfarbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250

bindet an unpolare und basische Seitenketten von Proteinen und ändert dabei sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm. 180 µl Bradford Reagenz wurden auf eine 96-Well-Platte gegeben und mit je 20 µl 1:10 verdünnter Probe vermischt. Eine Standardkonzentrationsreihe wurde mit dem Standardprotein Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) erstellt und daraus eine Eichkurve ermittelt. Mit einem Spektrophotometer wurde die Extinktion des gebildeten Protein-Farbstoff-Komplexes bei 595 nm gemessen und anschließend die Proteinkonzentration mittels linearer Regression bezogen auf die BSA-Eichgerade berechnet.

6.6.3 SDS-PAGE

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) wurden Proteinmischungen anhand ihres Molekulargewichts anhand erprobter laborinterner Protokolle unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins wurden ein achtprozentiges oder zwölfprozentiges Trenngel sowie ein vierprozentiges Sammelgel aus Acrylamid verwendet.

Reagenz	Trenngel 8%	Trenngel 12%	Sammelgel 4%
40% Acrylamid	3.00 ml	4.50 ml	3.00 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	3.75 ml	3.75 ml	-
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	3.75 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	150 µl
H ₂ O	7.95 ml	6.45 ml	7.95 ml
10% APS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Tab. 20: Ansatz von Trenn- und Sammelgel.

Zudem wurden 65 µg Protein auf einer Gesamtlösung von 23,5 µl eingesetzt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch die Inkubation der Probenlösung mit 7 µl SDS-PAGE-Ladepuffer bei einer Temperatur von 95°C für 10 Minuten.

Reagenz	SDS-PAGE-Ladepuffer
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2,5 ml
10% SDS	2 ml
99% Glycerol	1 ml
Harnstoff	3,6 g
Bromphenolblau	10 mg
DTT	500 mg

Tab. 21: Ansatz des SDS-PAGE-Ladepuffers.

Nach dem Auftragen von 20,0 μ l der Probe und 7 μ l des Precision Plus Protein Standards Markers auf das Gel, erfolgte die Gelelektrophorese in einem SDS-PAGE-Laufpuffer.

Reagenz	SDS-PAGE-Laufpuffer
Tris-Base	25 mM
Glycin	190 mM
SDS	1%

Tab. 22: Ansatz des SDS-PAGE-Laufpuffers.

Das Gel lief bis zum Erreichen des Trenngels bei einer Spannung von 80 V, die Spannung wurde anschließend auf 120 V erhöht. Die gemessenen Werte wurden während der Analyse der Daten auf das Haushaltprotein (*housekeeping protein*) GAPDH bezogen.

6.6.4 Western Blot

Nach ihrer Auftrennung wurden die Proteine in Form eines Sandwiches (Abb. 7) in 1x Transferpuffer vom Gel auf eine Membran in der Elektrophoresekammer bei 20 V über Nacht geblottet.

Reagenz	1xTransferpuffer
Tris-Base	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20%

Tab. 23: Ansatz des 1x Transferpuffers.

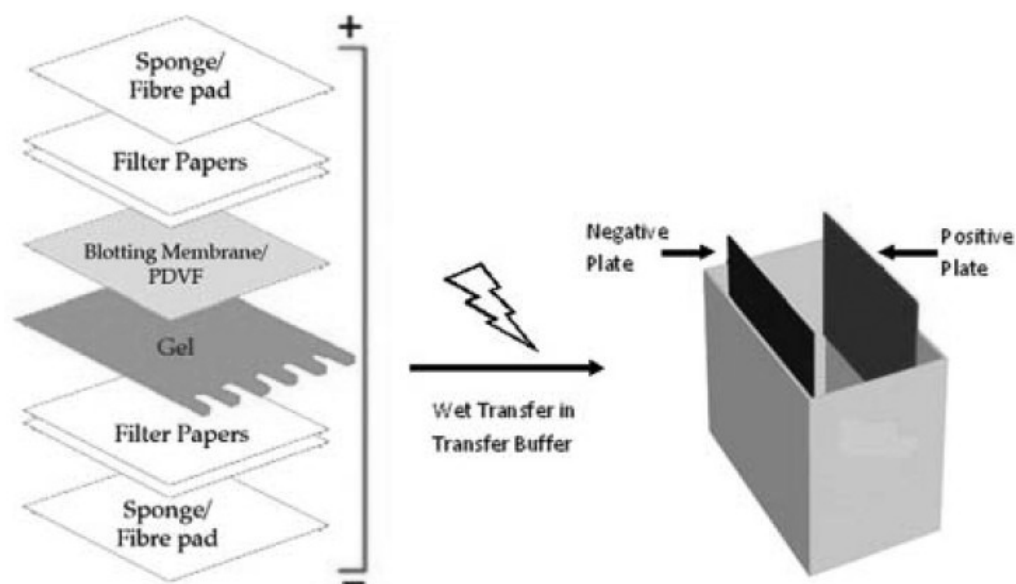


Abb. 7: **Aufbau des Western Blot-Sandwiches.** Modifiziert nach (Mahmood und Yang 2012).

6.6.5 Detektion von Immunproteinbanden

Um die freien Bindungsstellen der Blotmembran zu besetzen und somit unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde die Membran mit Milchlösung fünf Stunden bei 4°C geblockt. Nach Waschen der Membran mit 0,1% Tween, erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers in entsprechender Verdünnung in Milchlösung bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen der sekundäre Antikörper in analoger Art und Weise auf der Membran für eine Stunde inkubiert. Die Detektion der Immunproteinbanden erfolgte mit dem *Luminescent Image Analysis System (LAS) 3000* nach dem Chemilumineszenzprinzip. Die Membran wurde in einer Mischung aus dem ECL Western Blotting Detektion Reagenz A und B (1:1) im Dunkeln für eine Minute inkubiert. Die Expositionszeit lag je nach Antikörper zwischen 30 und 600 Sekunden. Die optische Dichte der Banden wurde mit einer *Charge Coupled Device (CCD)* Kamera gemessen und mithilfe der Software *Quantity One* der Firma Bio Rad quantifiziert. Es wurden identische Flächenbegrenzungen um die Chemilumineszenzsignale definiert. Durch Strippen der Membran konnten gebundene Antikörper entfernt und weitere Proteine detektiert werden.

6.7 Zellvitalität

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Zellvitalität wurde anhand entsprechender etablierter Vorversuche mit dem in der DNA interkalierenden

Farbstoff Ethidium-Homodimer-2 (EthD-2) überprüft. 2 µl EthD-2 pro 1 ml Medium wurden auf die Zellen gegeben und 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Eine Stunde bei -20°C in Methanol/Aceton 7:3 inkubierte hASCs dienten dabei als Positivkontrolle. Die Auswertung erfolgte am cLSM510 META mit dem 1 mW Helium/Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 535 nm und BP 560-625 sowie einem 20x Objektiv. Tote Zellen fluoreszieren rot, da durch den Zerfall der Kernmembran der Farbstoff in den Kern diffundieren kann. Es wurde aus 100 gezählten Zellen der Prozentsatz EthD-2 positiver Zellen berechnet.

6.8 Statistik

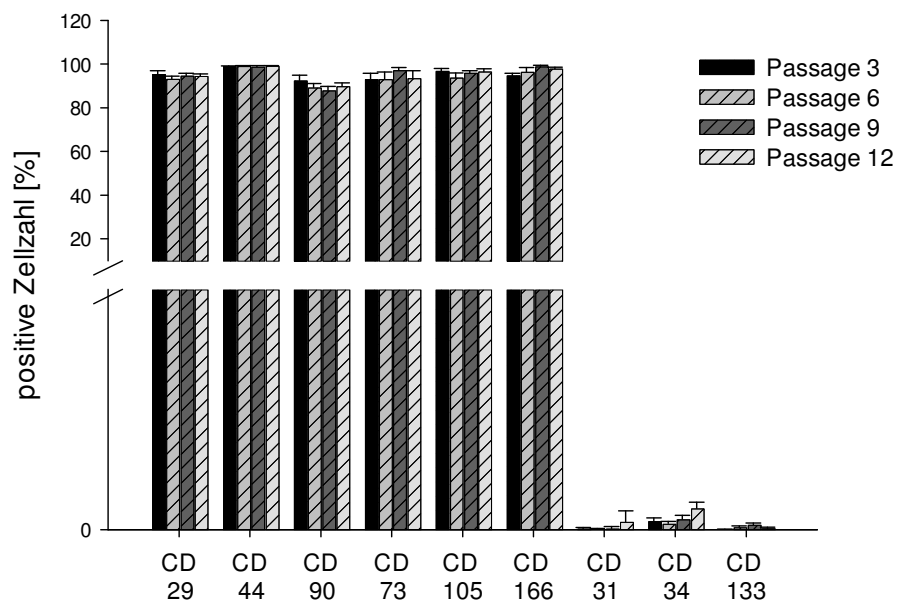
Alle Versuche wurden mit einer Anzahl von mindestens $n = 3$ unter den gleichen und standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert (MW) und Standardfehler (*standard error of mean, SEM*) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad InStat-3. Verwendet wurden der ungepaarte t-Test und die *one-way analysis of variance (ANOVA)*. Das Signifikanzniveau (*) wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

7 Ergebnisse

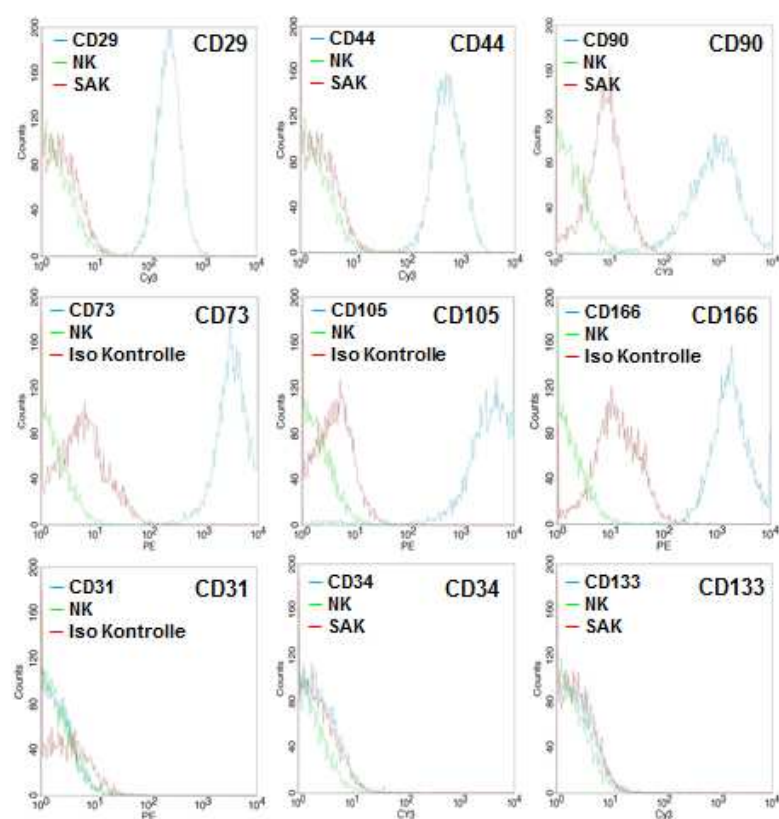
7.1 Charakterisierung der Oberflächenmarker von hASCs

Um morphologische Gemeinsamkeiten im Hinblick auf exprimierte Oberflächenantigene bei isolierten humanen fettabgeleiteten Stammzellen (hASCs) nachzuweisen und diese als mesenchymale Stammzellen zu charakterisieren, wurden von jedem verwendeten Patienten hASCs in den Passagen drei, sechs, neun und zwölf mittels FACS Analysen auf typische Oberflächenmarker überprüft. Isolierte hASCs wiesen ein positives Expressionsmuster für Marker der mesenchymalen Stammzellreihe auf (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166) (Abb. 8). Die Marker der hämatopoetischen und endothelialen Stammzellreihe (CD31, CD34 und CD133) waren dagegen negativ. Die relative Verteilung der Oberflächenmarker im Verlauf der Passagen drei, sechs, neun und zwölf blieb stets konstant.

A



B



C

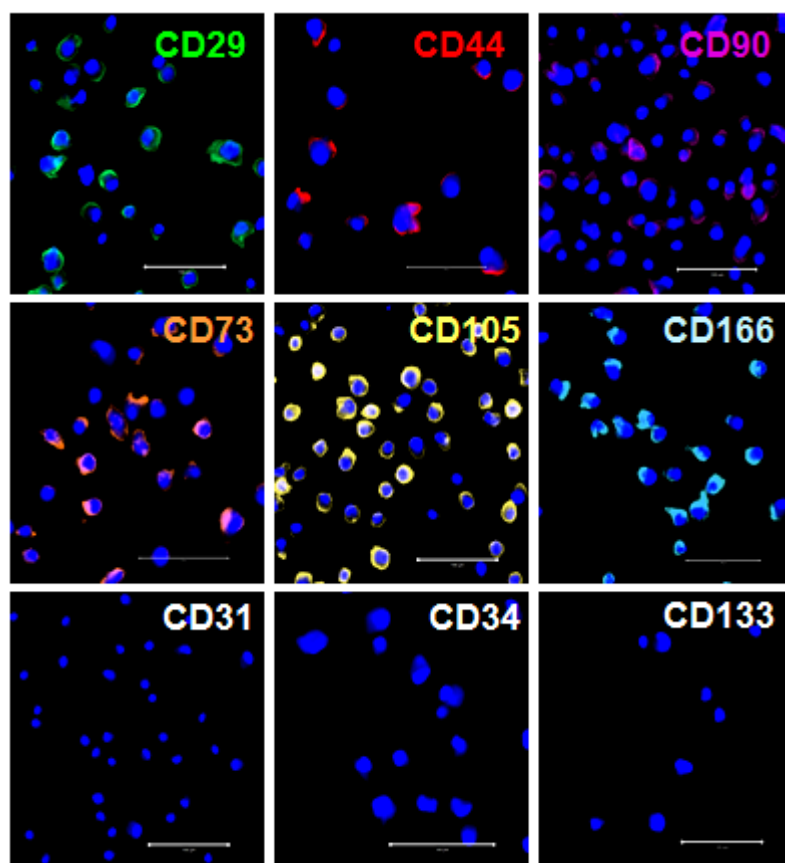


Abb. 8: **Charakterisierung der Oberflächenmarker von hASCs mittels FACS:** (A) Quantitative FACS-Analyse für die Passagen 3, 6, 9 und 12, $n = 7$, dargestellt als $MW \pm SEM$ (B) Graphische Darstellung der repräsentativen Durchflusszytometrie, blau = positive Zellen, grün = Negativkontrolle (NK), rot = sekundäre Antikörperkontrolle (SAK) oder Isotyp Kontrolle (C) Repräsentative Immuncytochemie (ICC) positiver und negativer Oberflächenmarker, Zellkern mit DAPI markiert (blau), Massstab = 100 μm

7.2 Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2, Oct3/4 und des Proliferationsmarkers Rex-1 in hASCs

Zum Nachweis der Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2, Oct3/4 und des Proliferationsmarker Rex-1 und des Expressionsverlaufs dieser Gene in isolierten hASCs wurde die relative mRNA-Expression in den Passagen drei, sechs, neun und zwölf analysiert. Hierbei zeigte sich eine nahezu konstante mRNA-Expression von NANOG, Sox-2, Oct3/4 und Rex-1 über alle Passagen. Ausschließlich die mRNA-Expression von NANOG schien in Passage neun und zwölf leicht erhöht zu sein (Abb. 9).

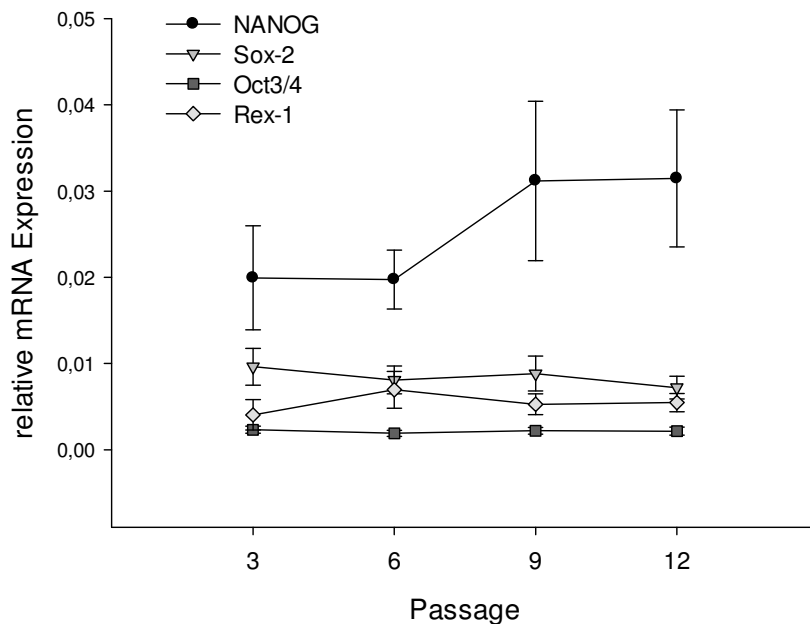


Abb. 9: **Relative mRNA-Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2, Oct3/4 und des Proliferationsmarkers Rex-1 in hASCs in Abhängigkeit von der Passage:** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real time* PCR, NANOG, Sox-2, Oct3/4 ($n = 17$), Rex-1 ($n = 12$), Daten dargestellt als $MW \pm SEM$

7.3 Einflussfaktoren auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

7.3.1 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Um den Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die Expression embryonaler Gene zu prüfen, wurden hASCs in drei verschiedenen Zelldichten von 4.000, 15.000 und 60.000 Zellen pro 1 ml Medium jeweils unter normoxischen (21% O₂) sowie hypoxischen (3% O₂) Bedingungen drei Tage standardisiert kultiviert. Dabei fiel auf, dass die relative mRNA-Expression von Sox-2 signifikant anstieg, wenn hASCs bei niedriger Zelldichte (20.000 Zellen / 5 ml) für drei Tage unter Hypoxie von 3% inkubiert wurden. Bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) zeigte sich ein höherer Einfluss von Hypoxie (3% O₂) auf die relative mRNA-Expression von Sox-2. Bei Betrachtung der mittleren Zelldichte (15.000 Zellen / ml) waren tendenzielle, aber keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Wenn man aber die Werte bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Normoxie (21% O₂) und unter Hypoxie (3% O₂) mit denen bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) verglich, war die relative mRNA-Expression von Sox-2 erneut signifikant erhöht. Es zeigte sich bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) ein zunehmender Einfluss dieser (Abb. 14 A). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in der Immunocytochemie. Bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) ist die Proteinexpression von Sox-2 höher als bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml). Allerdings schien hier bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) die Proteinaktivität von Sox-2 unter Normoxie (21% O₂) höher zu sein als unter Hypoxie (3% O₂) (Abb. 14 B).

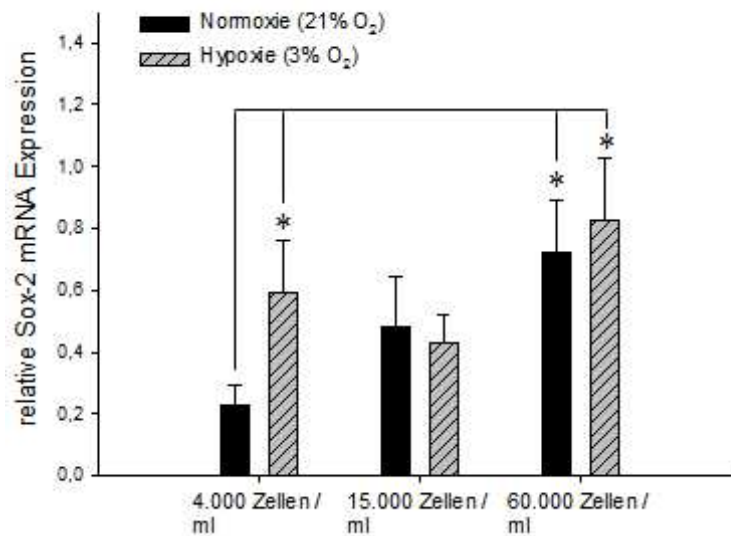
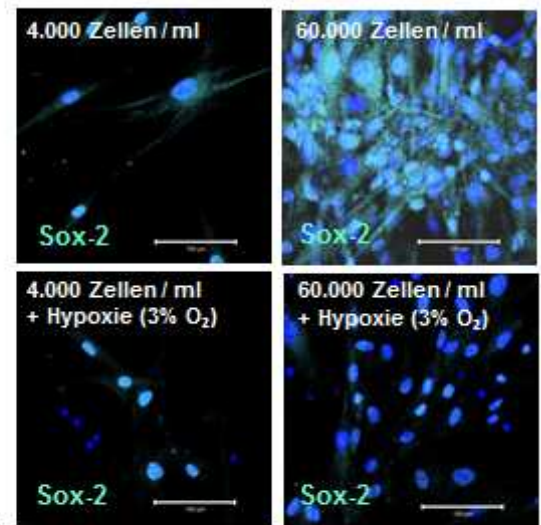
A**B**

Abb. 14: **Signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von Sox-2 durch Hypoxie (3% O₂) und hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml):** (A) Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05, (B) Repräsentative Immuncytochemie (ICC) von Sox-2 (türkis), Zellkern mit DAPI markiert (blau), Massstab = 100 µm

Weder NANOG noch Oct3/4 zeigten signifikante Unterschiede in der relativen mRNA-Expression in Bezug auf Zelldichte und Hypoxie. Durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) in Kombination mit Hypoxie (3% O₂) waren die relativen mRNA-Expressionen von NANOG und Oct3/4 allerdings tendenziell erhöht (Abb. 16).

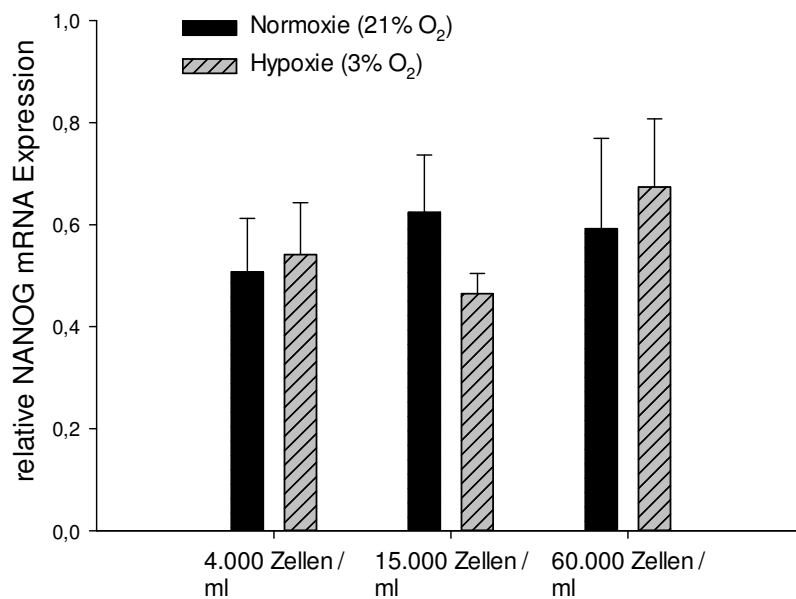
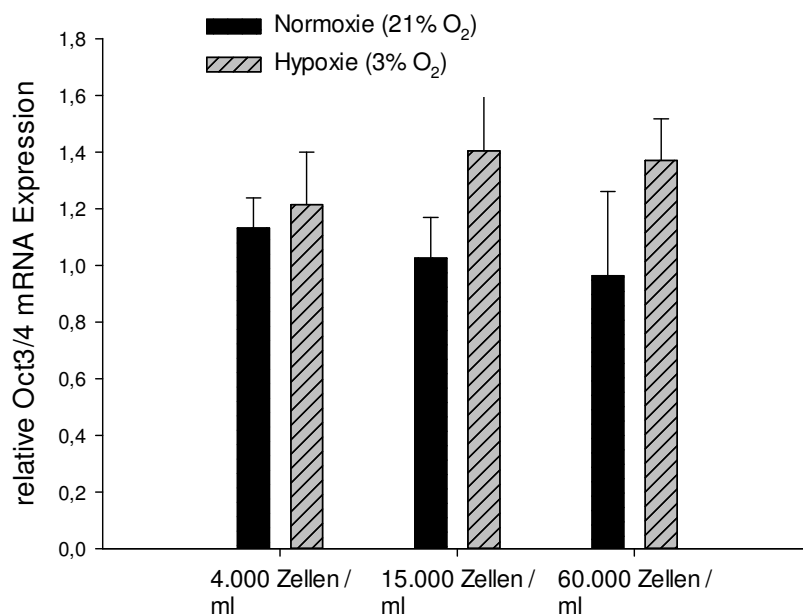
A**C**

Abb. 16: Unveränderte relative mRNA-Expression von NANOG und Oct3/4 durch Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml): Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM

Um hASCs hinsichtlich ihrer Proliferationsrate unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (3% O₂) sowie bei unterschiedlichen Zelldichten zu untersuchen, wurde die relative mRNA-Expression von Rex-1 in isolierten hASCs bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant herunterreguliert wurde, wenn hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) kultiviert wurden. Analoges konnte bei einer Kultivierung der hASCs unter hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) und gleichzeitiger Hypoxieexposition (3% O₂) nachgewiesen werden. Alleinige Hypoxie zeigte keine Veränderungen. Bei mittlerer Zelldichte (15.000 Zellen / ml) fielen nur tendenzielle, aber noch keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 15).

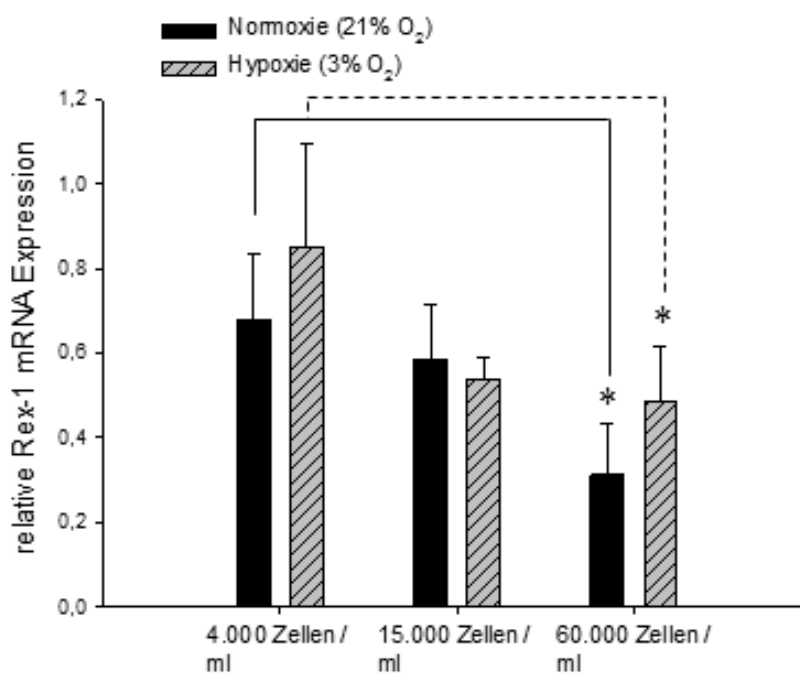


Abb. 15: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von Rex-1 durch Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml):** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels PCR, n = 4, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.3.2 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) mit anschließender Normoxie (21% O₂) auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Zur Untersuchung des Einflusses von Hypoxie (3% O₂) auf hASCs, wurden hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) für drei Tage unter Hypoxie (3% O₂) kultiviert und anschließend weitere drei Tage mit Normoxie (21% O₂) behandelt. Die relative mRNA-Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 wurde bestimmt. Als

Kontrolle wurden Zellen in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) für sechs Tage unter Normoxie (21% O₂) kultiviert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression von NANOG, wenn hASCs nach drei Tagen Hypoxie (3% O₂) weitere drei Tage unter Normoxie (21% O₂) kultiviert wurden (Abb. 18 A). Die relative mRNA-Expression von Sox-2 war bei Kultivierung unter Normoxie (21% O₂) nach Hypoxie (3% O₂) tendenziell, aber nicht signifikant erhöht, während die relative mRNA-Expression von Oct3/4 keine signifikanten Veränderungen zeigte (Abb. 18 B + C).

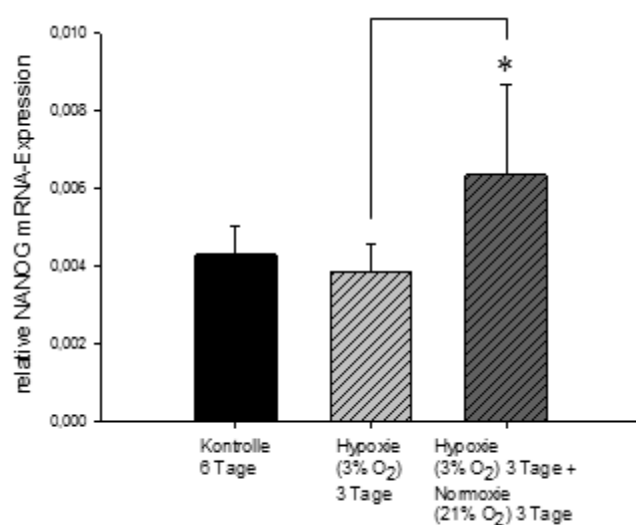
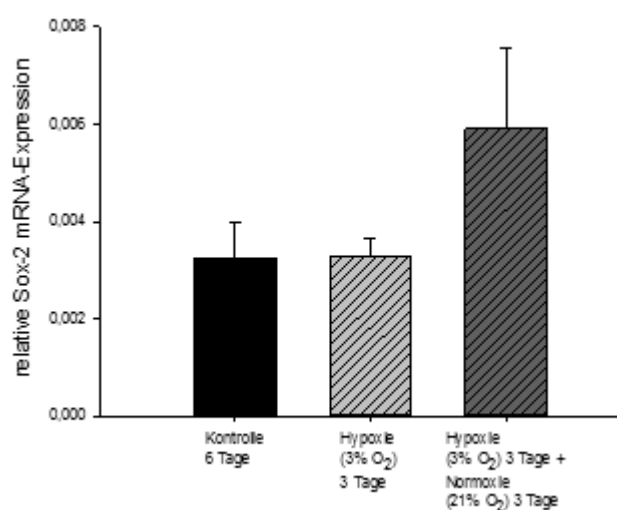
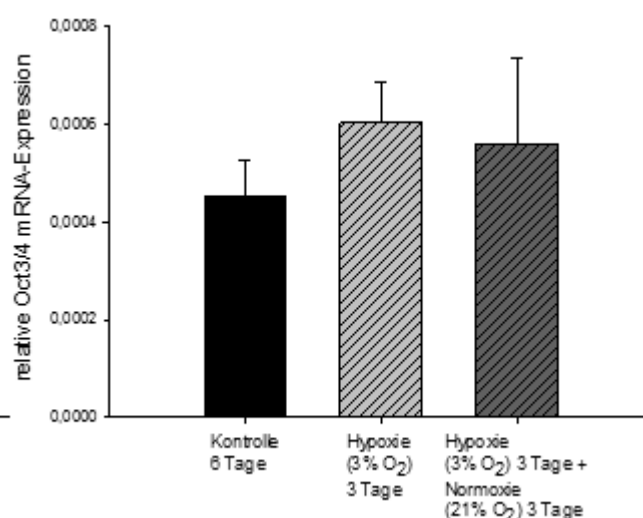
A**B****C**

Abb. 18: **Signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von NANOG nach dreitägiger Hypoxie (3% O₂) mit anschließender dreitägiger Normoxie (21% O₂):** (A) NANOG, (B) Sox-2, (C) Oct3/4, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

Weiterhin wurde die mRNA-Expression von Rex-1 analysiert, nachdem hASCs zunächst drei Tage in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Hypoxie (3% O₂) und daraufhin drei Tage unter Normoxie (21% O₂) inkubiert wurden. Zellen in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) für sechs Tage unter Normalbedingungen dienten als Kontrolle. Es fiel auf, dass die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant erniedrigt war, wenn hASCs unter Normoxie (21% O₂) inkubiert wurden, nachdem sie zuvor mit Hypoxie (3% O₂) behandelt wurden (Abb. 19).

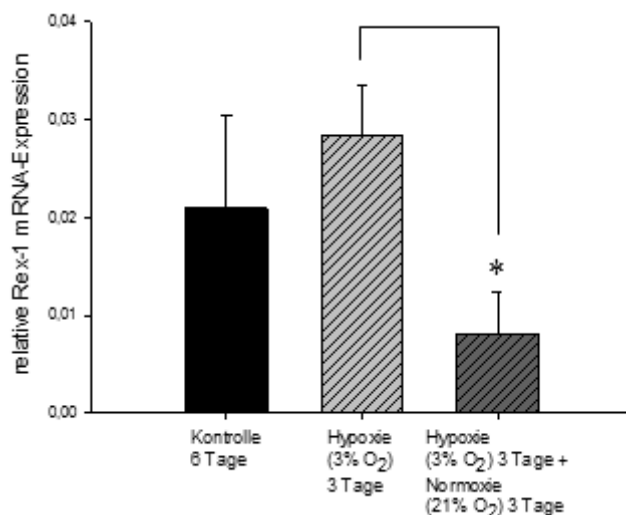


Abb. 19: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von Rex-1 nach dreitägiger Hypoxie (3% O₂) mit anschließender dreitägiger Normoxie (21% O₂):** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.3.3 Einfluss von verlängerter Expositionsdauer unter Hypoxie auf embryonaler Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Um Aussagen darüber treffen zu können, wie lange Hypoxie auf hASCs wirken muss, um Veränderungen der mRNA-Expression embryonaler Gene zu bewirken, wurde der Einfluss der Expositionsdauer von Hypoxie auf hASCs überprüft. Hierzu wurden die Zellen drei und zehn Tage unter Hypoxie (3% O₂) inkubiert. Parallel wurde eine Kontrolle mit hASCs, die zehn Tage unter Normoxie (21% O₂) kultiviert wurden,

analysiert. Die Zellen wurden standardisiert in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) kultiviert. Die mRNA-Expressionen von NANOG und Oct3/4 waren nach zehn Tagen unter Hypoxie (3% O₂) tendenziell im Vergleich zu drei Tagen unter Hypoxie (3% O₂) erhöht, während die mRNA-Expression von Sox-2 nach zehn Tagen unter Hypoxie (3% O₂) abfiel (Abb. 20).

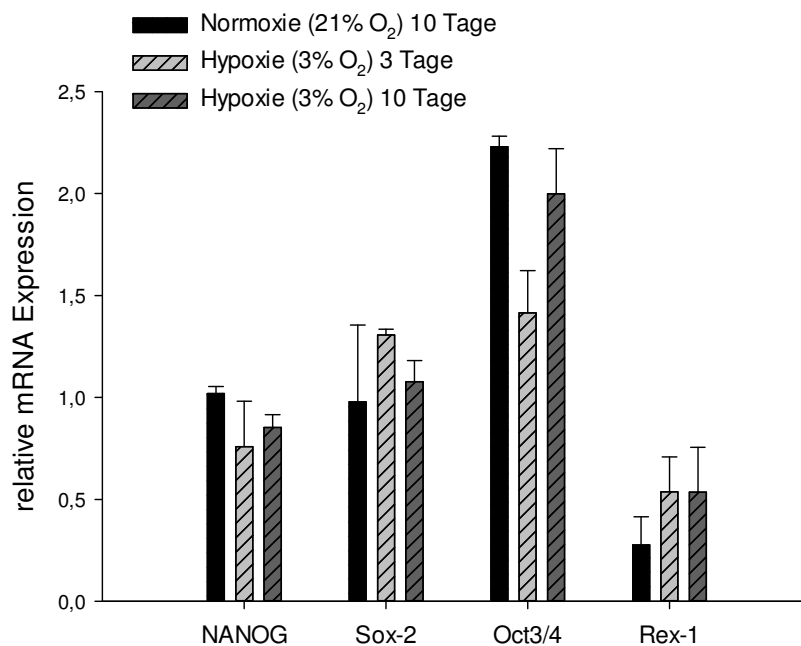


Abb. 20: **Einfluss der Expositionsdauer unter Hypoxie (3% O₂) auf die relative mRNA-Expression embryonaler Gene und des Proliferationsmarkers Rex-1:** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels PCR, n = 3, Daten dargestellt als MW ± SEM

7.3.4 Einfluss von chemischer Hypoxie durch DFX auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Um die Wirkung von Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt und chemischer Hypoxie durch Zugabe von Deferoxamin-Mesylat (DFX) in einer Konzentration von 200 µM auf hASCs zu vergleichen, wurden die Zellen unter Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt und chemische Hypoxie induziert durch 200 µM DFX drei Tage kultiviert. Als Kontrolle wurden hASCs unter normoxischen Bedingungen (21% O₂) verwendet. Es wurden ausschließlich hohe Zelldichten (60.000 Zellen / ml) verwendet, um den experimentellen Ablauf zu standardisieren. Bei den Genen NANOG und Rex-1 war die relative mRNA-Expression durch chemische Hypoxie (200 µM DFX) signifikant erniedrigt gegenüber Zellen, die unter Normoxie (21% O₂) kultiviert wurden (Abb. 21 A + B). Sox-2 und

Oct3/4 dagegen zeigten keine signifikante Änderung der mRNA-Expression durch DFX (Abb. 21 C + D).

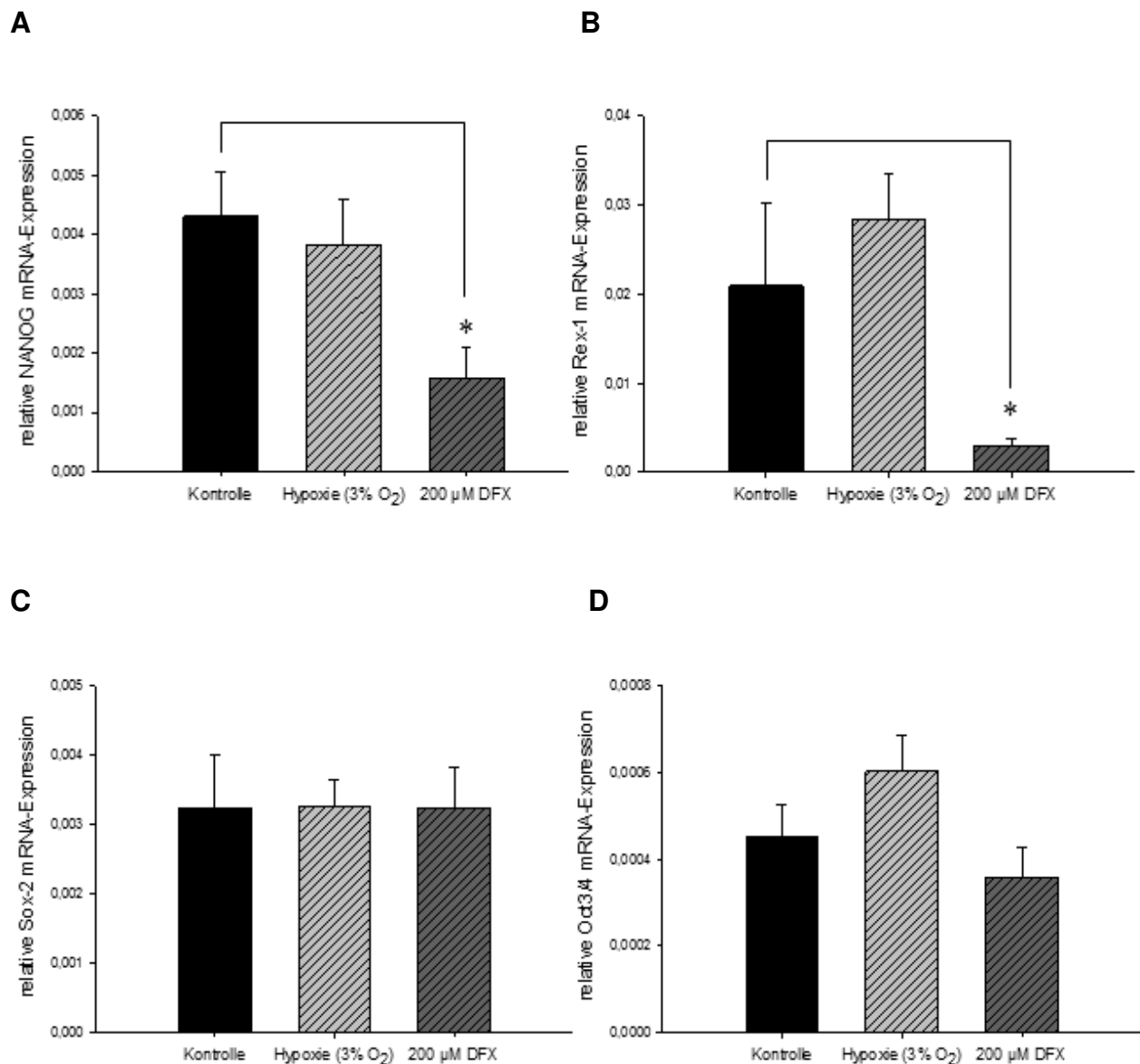
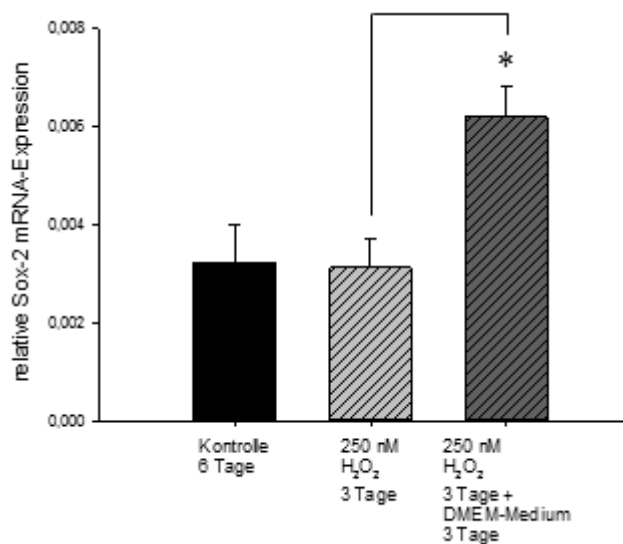
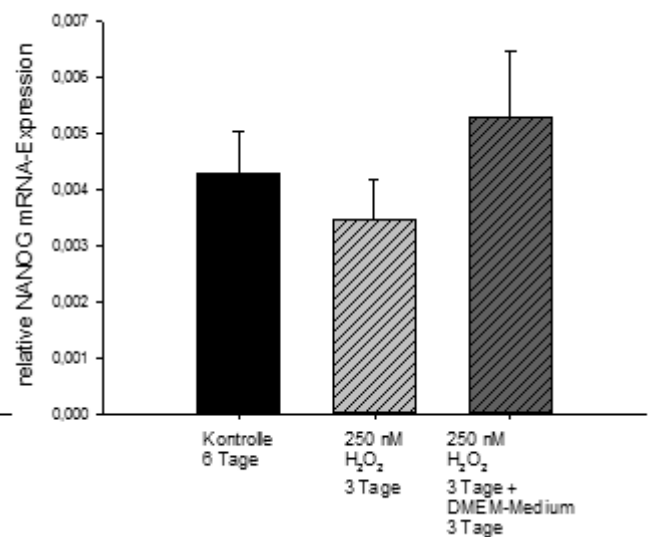


Abb. 21: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von NANOG und Rex-1 unter chemischer Hypoxie vermittelt durch 200 µM DFX:** (A) NANOG, (B) Rex-1, (C) Sox-2, (D) Oct3/4, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.3.5 Einfluss von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Zur Überprüfung des Effektes von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf hASCs wurden diese für drei Tage in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) in Kombination mit H₂O₂ in einer Endkonzentration von 250 nM inkubiert und danach die gleichen Proben mit einfachem

DMEM-Medium ohne H_2O_2 für weitere drei Tage kultiviert. H_2O_2 wurde dabei täglich neu auf die Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) sechs Tage unter Normalbedingungen kultiviert. In diesem Versuch zeigte sich eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression von Sox-2, wenn hASCs zunächst mit 250 nM H_2O_2 und anschließend mit normalem Medium über insgesamt sechs Tage inkubiert wurden (Abb. 22 A). Bei der relativen mRNA-Expression von NANOG ließ sich eine vergleichbare, aber nicht signifikante Tendenz nachweisen (Abb. 22 B). Die relativen mRNA-Expressionen von Oct3/4 und Rex-1 waren durch Kultivierung mit H_2O_2 und anschließender Inkubation mit unbehandeltem Medium tendenziell erniedrigt (Abb. 22 C + D).

A**B**

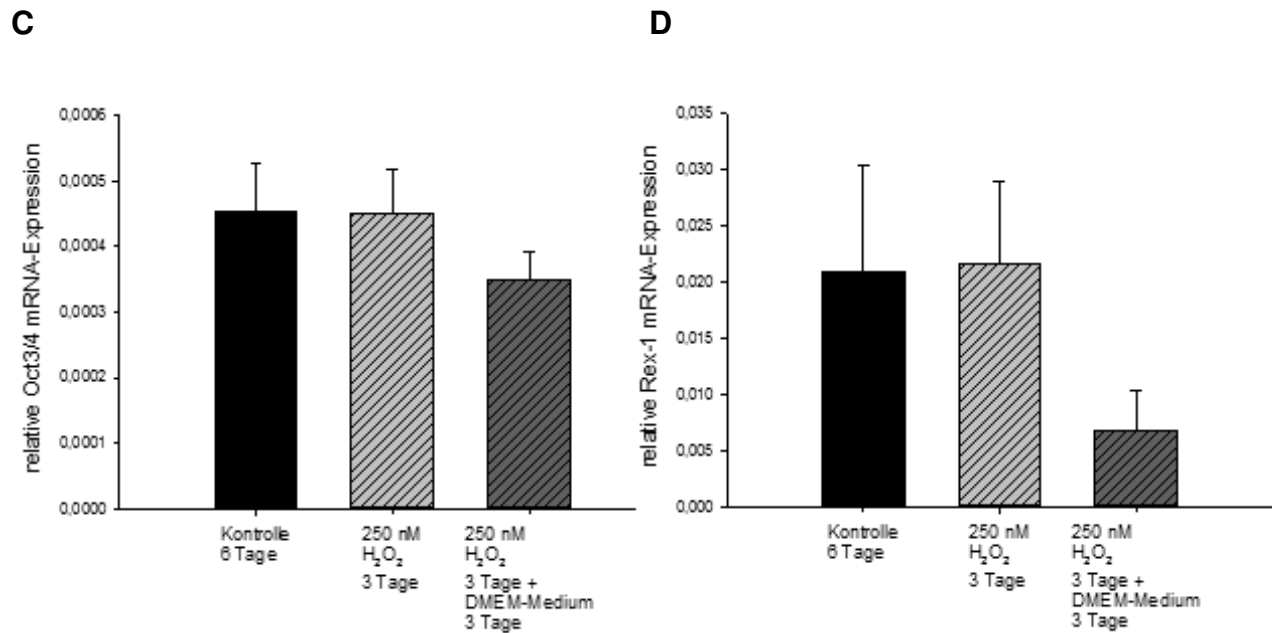


Abb. 22: **Signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von Sox-2 nach Inkubation mit 250 nM H_2O_2 für drei Tage und anschließender Kultivierung mit unbehandeltem DMEM-Medium für weitere drei Tage:** (A) Sox-2, (B) NANOG, (C) Oct3/4, (D) Rex-1, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, $n = 5$, Daten dargestellt als $MW \pm SEM$, * entspricht $p < 0,05$

7.3.6 Einfluss der Verlängerung der Inkubationszeit mit H_2O_2 auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 bei hASCs

Um den Einfluss der zeitlichen Komponente auf die Expression embryonaler Gene unter H_2O_2 zu prüfen, wurden hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) drei und zehn Tage mit H_2O_2 kultiviert. Als Kontrolle wurden hASCs kultiviert, die standardisiert in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) mit normalem DMEM-Medium zehn Tage inkubiert wurden. Unter zehntägiger Kultivierung mit 250 nM H_2O_2 stieg die relative mRNA-Expression von NANOG und Oct3/4 signifikant im Vergleich zur dreitägigen Inkubation mit 250 nM H_2O_2 sowie zur Kontrolle an (Abb. 23). Die relative mRNA-Expression von Sox-2 erhöhte sich tendenziell, aber nicht signifikant.

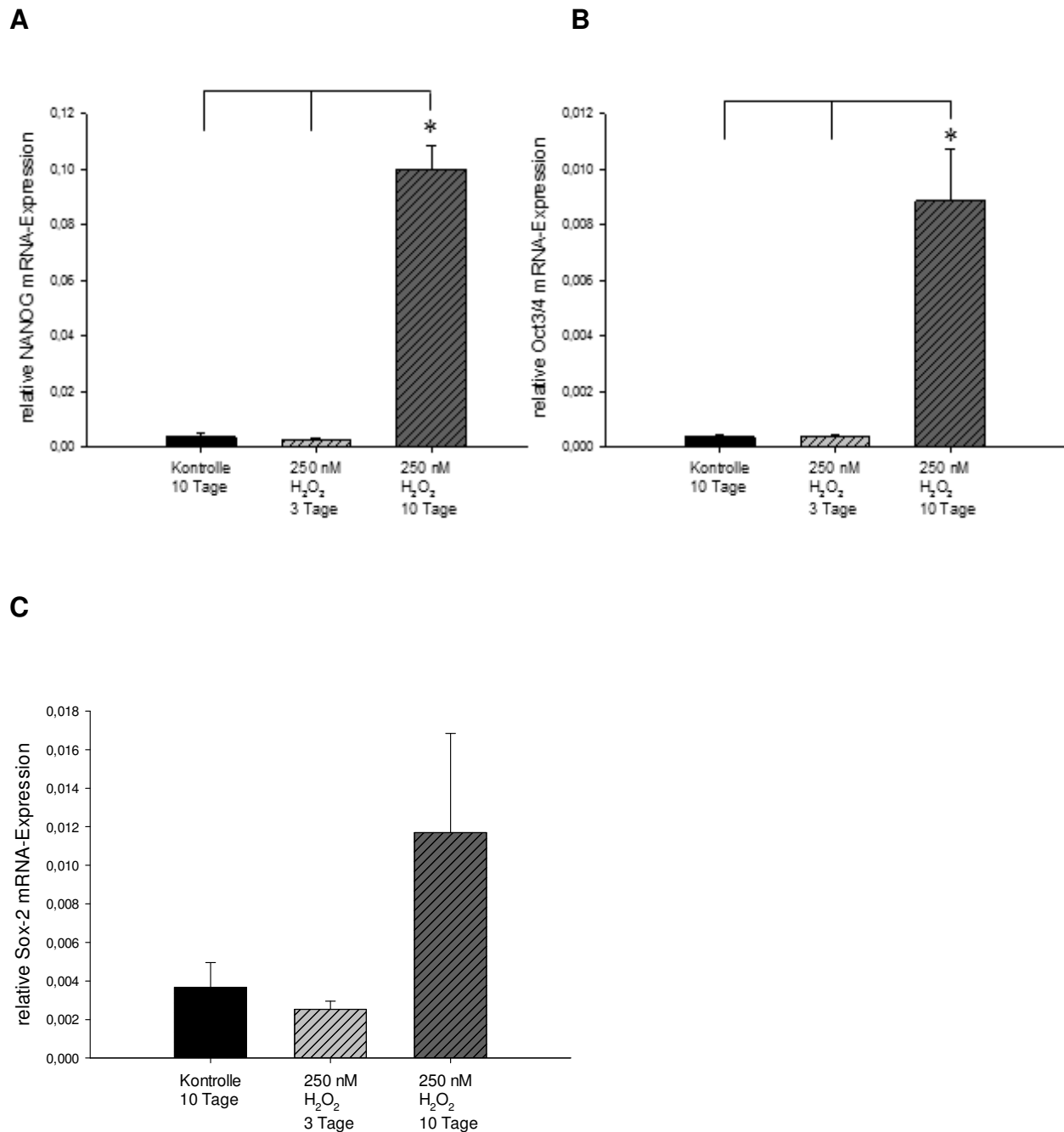


Abb. 23: **Verlängerung der Inkubationsdauer mit 250 nM H_2O_2 auf zehn Tage erhöht signifikant die relative mRNA-Expression von NANOG und Oct3/4:** (A) NANOG, (B) Oct3/4, (C) Sox-2, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, $n = 3$, Daten dargestellt als MW \pm SEM, * entspricht $p < 0,05$

Im Gegensatz dazu wurde durch eine Verlängerung der Inkubationszeit mit 250 nM H_2O_2 von drei auf zehn Tagen die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant vermindert (Abb. 24).

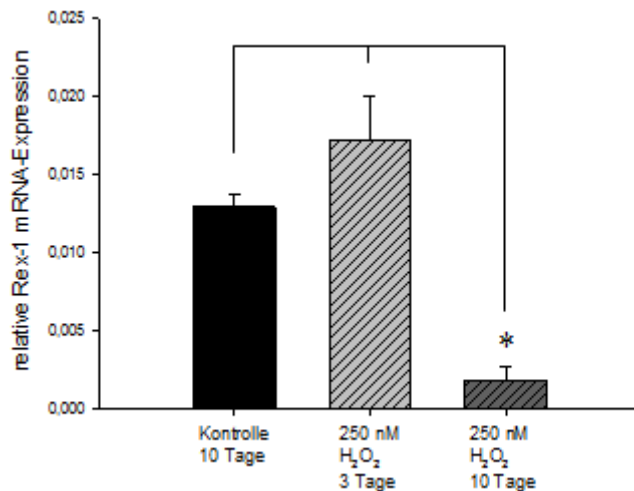


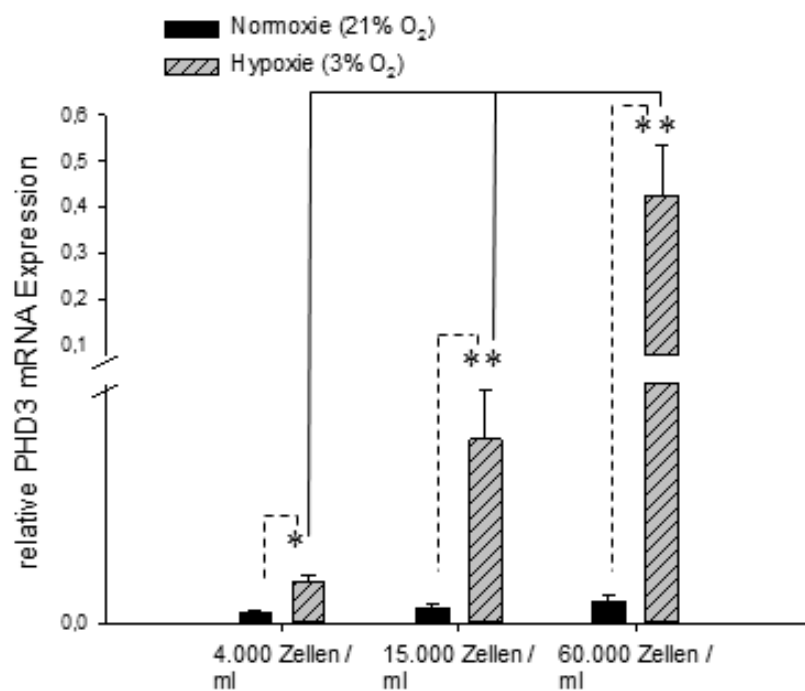
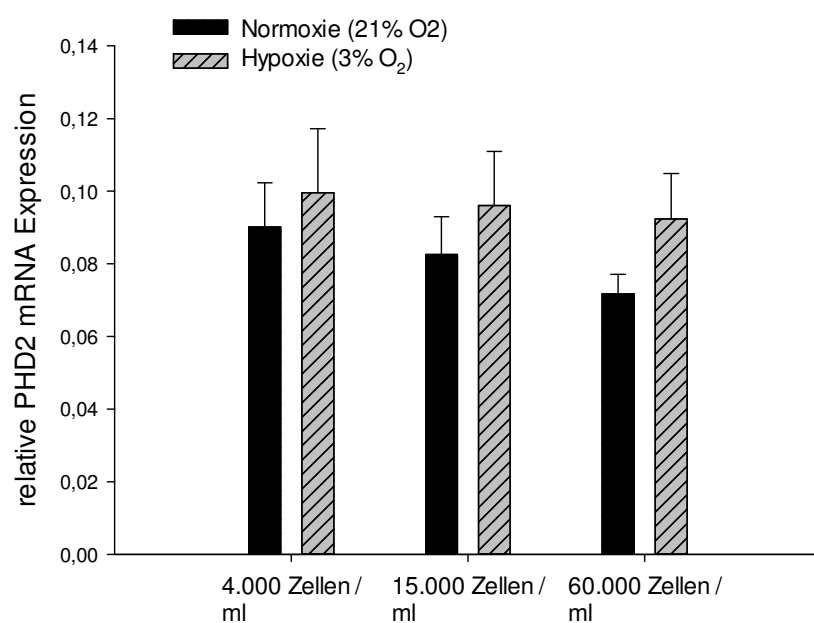
Abb. 24: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von Rex-1 durch verlängerte Inkubation von hASCs mit 250 nM H₂O₂ auf zehn Tage:** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, $n = 3$, Daten dargestellt als MW \pm SEM, * entspricht $p < 0,05$

7.4 Vermittlung der Wirkung von Einflussfaktoren

7.4.1 Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3) als Sauerstoffsensor in hASCs

7.4.1.1 Wirkung von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs

Um die Wirkung von Hypoxie (3% O₂) kombiniert mit steigender Zelldichte auf molekularer Ebene zu überprüfen, wurden hASCs drei Tage unter Hypoxie von 3% und in drei zunehmenden Zelldichten von 4.000, 15.000 und 60.000 Zellen pro 1 ml Medium kultiviert und die mRNA-Expression von PHD3 gemessen. Dabei fiel interessanter Weise auf, dass eine zunehmende Zelldichte unter Normoxie (21% O₂) die relative mRNA-Expression von PHD3 nicht beeinflusst. Erst durch die Reduzierung des Sauerstoffgehalts auf 3% war eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von PHD3 messbar. Dieser Effekt verstärkte sich nochmals durch eine steigende Zelldichte (Abb. 25 A). Demgegenüber waren keine signifikanten Veränderungen der relativen mRNA-Expression von PHD2 und HIF1AN zu verzeichnen (Abb. 25 B + C). PHD1 war zu keiner Zeit in hASCs signifikant exprimiert.

A**B**

C

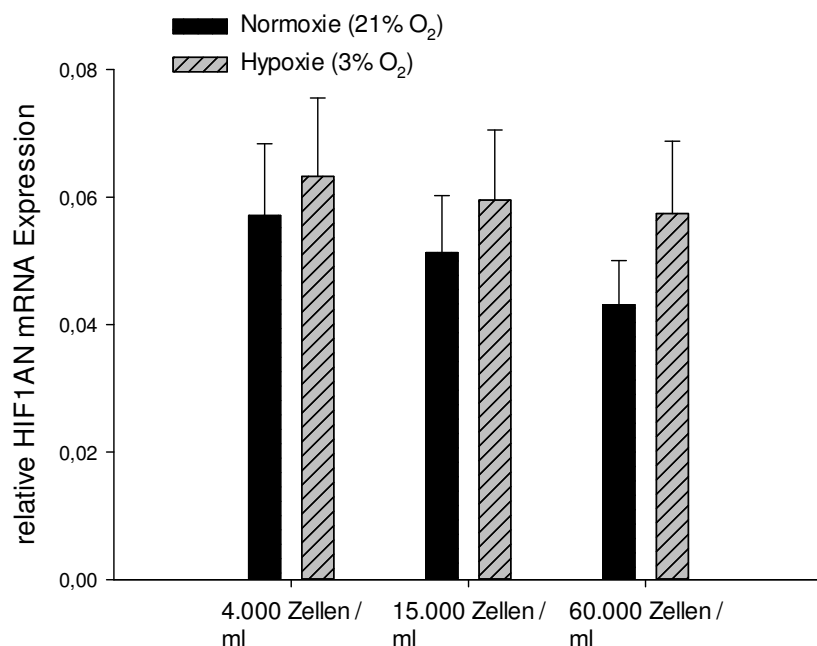


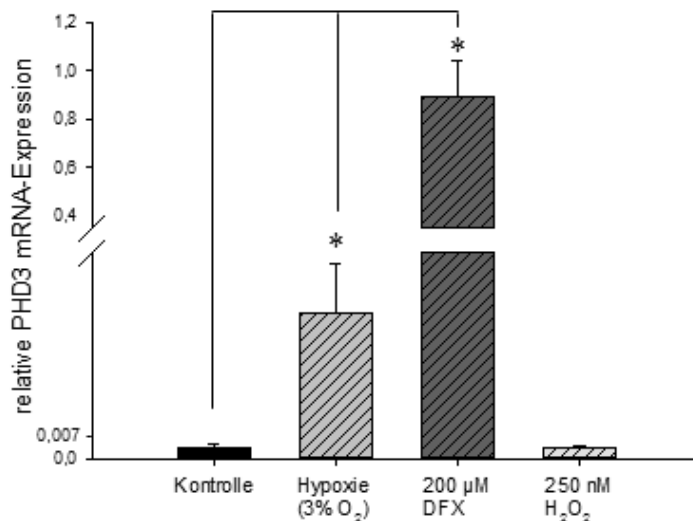
Abb. 25: **Die relative mRNA-Expression von PHD3 wird durch Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit steigender Zelldichte signifikant erhöht:** (A) PHD3, (B) PHD2, (C) HIF1AN, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 4, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.4.1.2 Wirkung von chemischer Hypoxie vermittelt durch DFX und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs

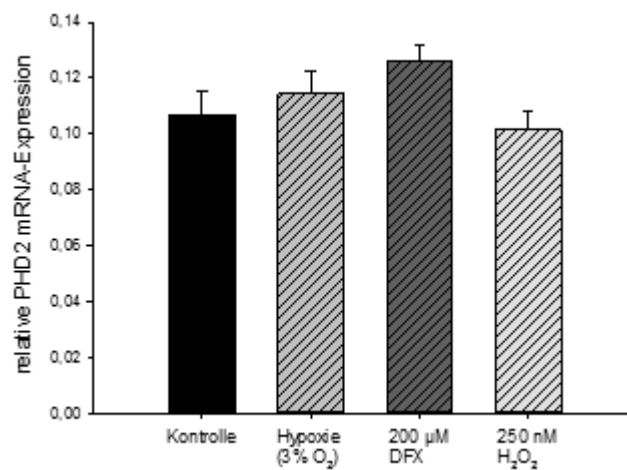
Zur Klärung des Einflusses von chemischer Hypoxie durch DFX und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf hASCs, wurden hASCs für drei Tage mit 200 µM Deferoxamin-Mesylat (DFX) und 250 nM H₂O₂ in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) inkubiert. hASCs standardisiert in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Hypoxie (3% O₂) und mit einfachem DMEM-Medium wurden für drei Tage als Kontrolle kultiviert. Es war zu beobachten, dass die mRNA-Expression von PHD3 auch unter chemischer Hypoxie signifikant anstieg. Die Erhöhung der relativen mRNA-Expression von PHD3 durch chemische Hypoxie vermittelt durch DFX war zudem um den Faktor 15 größer verglichen mit Hypoxie durch reduzierten Sauerstoffgehalt auf 3%. Die Kombination aus chemischer und physiologischer Hypoxie führte zu keinem weiteren Effekt. Weiterhin war zu beobachten, dass H₂O₂ keine signifikante Veränderung der relativen mRNA-Expression von PHD3 im Vergleich zur Kontrolle zeigte. (Abb. 26 A). Im Gegensatz

dazu blieben die relative mRNA-Expression von PHD2 und HIF1AN unter analogen Bedingungen unverändert (Abb. 26 B + C).

A



B



C

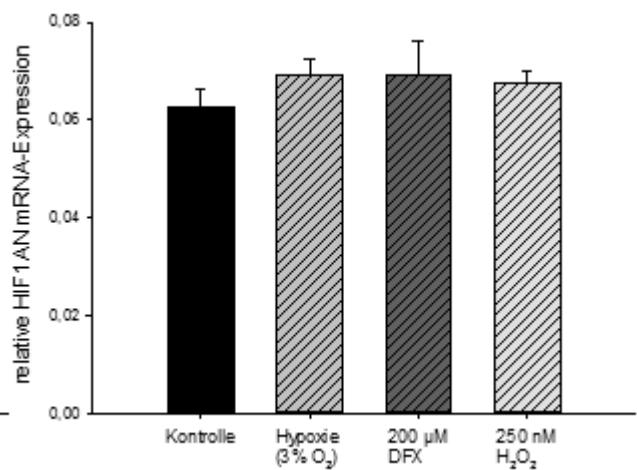
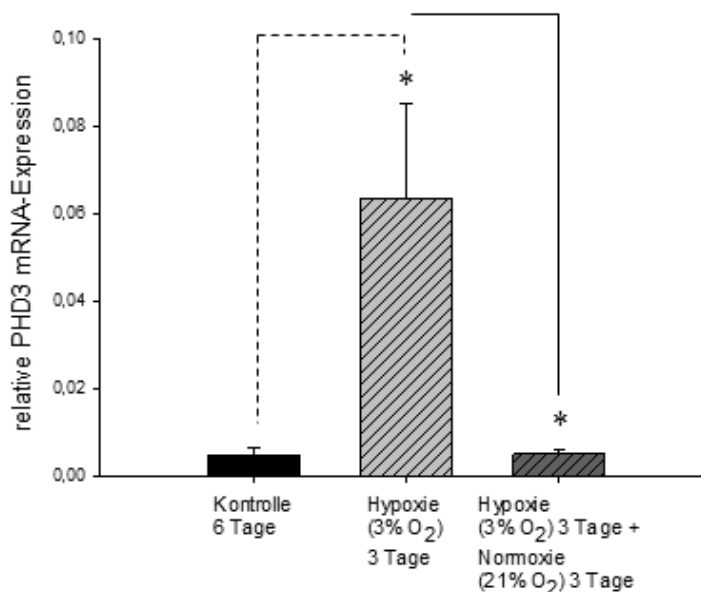


Abb. 26: **Signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von PHD3 durch dreitägige chemische Hypoxie vermittelt durch 200 µM DFX alleine und in Kombination mit 250 nM H₂O₂:** (A) PHD3, (B) PHD2, (C) HIF1AN, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.4.1.3 Wirkung von Hypoxie (3% O₂) und anschließender Normoxie (21% O₂) auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs

Zum Nachweis der Reversibilität der Veränderung der mRNA-Expression von PHD3 in hASCs unter Hypoxie (3% O₂), wurden hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) zunächst drei Tage unter physiologischer Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 3% und anschließend unter Normoxie (21% O₂) für weitere drei Tage inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von insgesamt sechs Tagen, wurde die relative mRNA-Expression von PHD3 bestimmt. Als Kontrolle wurden hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) sechs Tage unter Normalbedingungen (21% O₂) kultiviert. Nach dreitägiger Hypoxie von 3% Sauerstoffgehalt, war die relative mRNA-Expression von PHD3 im Vergleich zur Kontrolle erneut signifikant erhöht. Durch den normalen Sauerstoffgehalt von 21% fiel die relative mRNA-Expression von PHD3 erneut signifikant ab und zwar auf analoge Werte, wie vor der Hypoxieexposition (Abb. 27 A). Die Transkription von PHD3 in hASCs scheint demnach besonders sensitiv und reversibel reguliert zu werden. Die relativen mRNA-Expressionen von PHD2 und HIF1AN zeigten keine signifikanten Veränderungen in diesem Versuch (Abb. 27 B + C).

A



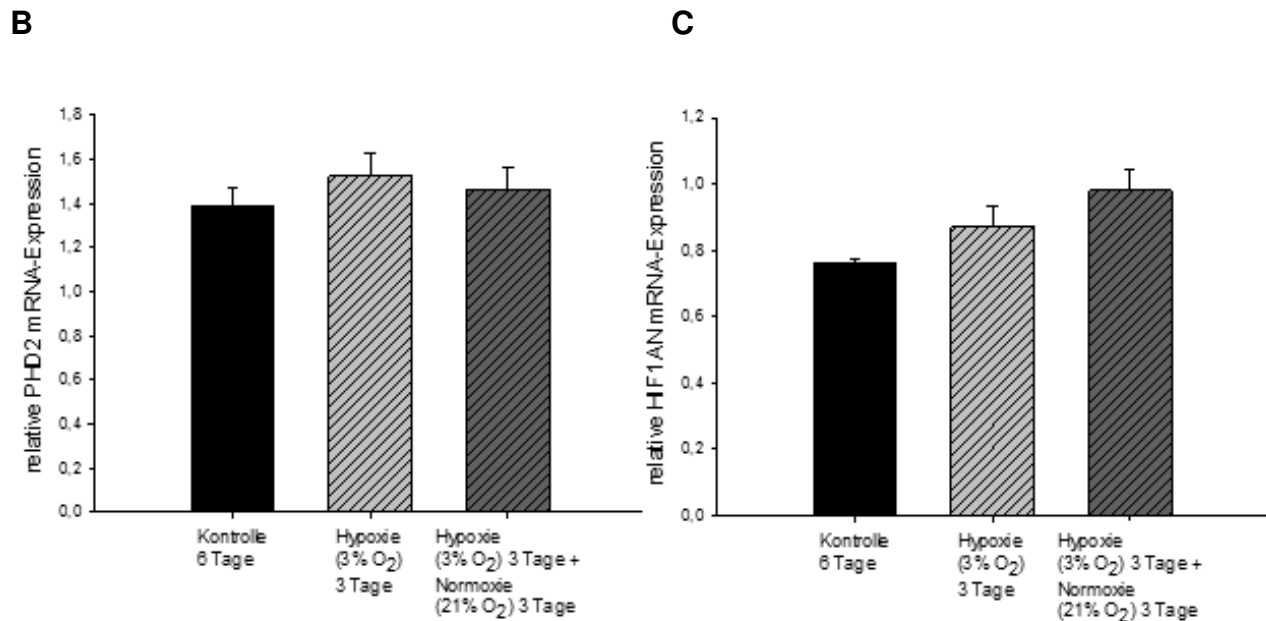


Abb. 27: **Signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression von PHD3 nach dreitägiger Hypoxie (3% O₂) mit signifikanter Erniedrigung durch anschließende dreitägige Normoxie (21% O₂) in hASCs:** (A) PHD3, (B) PHD2, (C) HIF1AN, Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 5, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05

7.4.2 Hypoxie-induzierbarer Faktor Hif 1α als Signalmolekül für Hypoxie in hASCs

7.4.2.1 Wirkung von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von Hif 1α in hASCs

Um die regulatorische Rolle eines weiteren für Hypoxie entscheidenden Moleküls zu untersuchen, wurden hASCs für drei Tage unter Normoxie (21 % O₂) und Hypoxie (3% O₂) sowie in drei verschiedenen ansteigenden Zelldichten (4.000, 15.000 und 60.000 Zellen pro 1 ml Medium) kultiviert. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression von Hif 1α analysiert. Hierbei fiel auf, dass eine zunehmende Zelldichte unter Normoxie (21% O₂) die relative mRNA-Expression von Hif 1α tendenziell, aber nicht signifikant senkte. Wenn allerdings hASCs in niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) und unter Hypoxie (3% O₂) kultiviert wurden, war eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression von Hif 1α zu verzeichnen (Abb. 28).

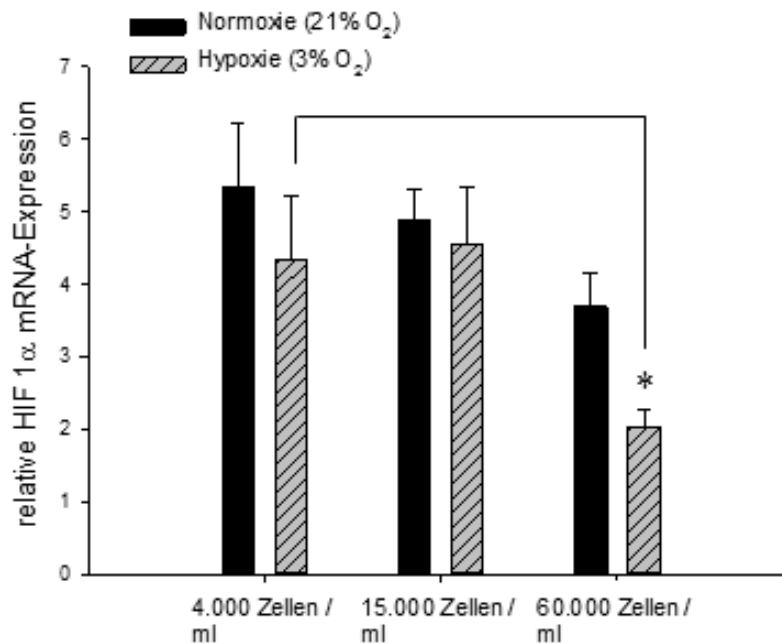


Abb. 28: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von Hif 1 α unter Hypoxie (3% O₂) kombiniert mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml):** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 4, Daten dargestellt als MW \pm SEM, * entspricht p < 0,05

Um die Expression von Hif 1 α darüber hinaus auf Proteinebene zu analysieren, wurde mittels Western Blot die relative Proteinkonzentration von Hif 1 α unter jeweils normoxischen (21% O₂) und hypoxischen (3% O₂) Bedingungen sowie in niedriger (4.000 Zellen / ml) und hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) bestimmt. Die Dauer jedes Versuchsansatzes betrug standardisiert drei Tage. Auch hierbei ließ sich feststellen, dass die relative Verteilung des Proteins Hif 1 α bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) tendenziell niedriger war als bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml). Interessanterweise stieg die Proteinkonzentration von Hif 1 α leicht unter hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) und Hypoxie (3% O₂) an (Abb. 29).

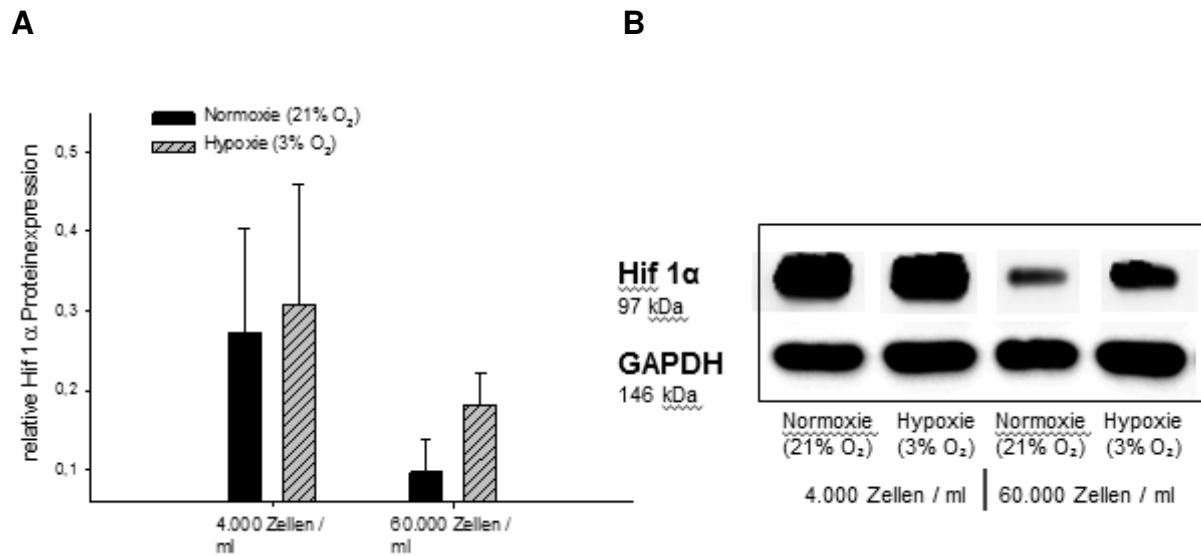


Abb. 29: **Erniedrigte relative Proteinexpression von Hif 1α durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml):** (A) Graphische Darstellung der relativen, gegen GAPDH normalisierten Proteinexpression mittels Western Blot, n = 3, Daten dargestellt als MW ± SEM, (B) Repräsentative Western Blot Banden von Hif 1α

Zudem wurde die relative Proteinexpression von Hif 3α unter analogen Bedingungen mittels Western Blot gemessen. Hier zeigte sich im Gegensatz zu Hif 1α eine tendenzielle Erhöhung der Proteinexpression von Hif 3α, wenn hASCs in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) kultiviert wurden (Abb. 30).

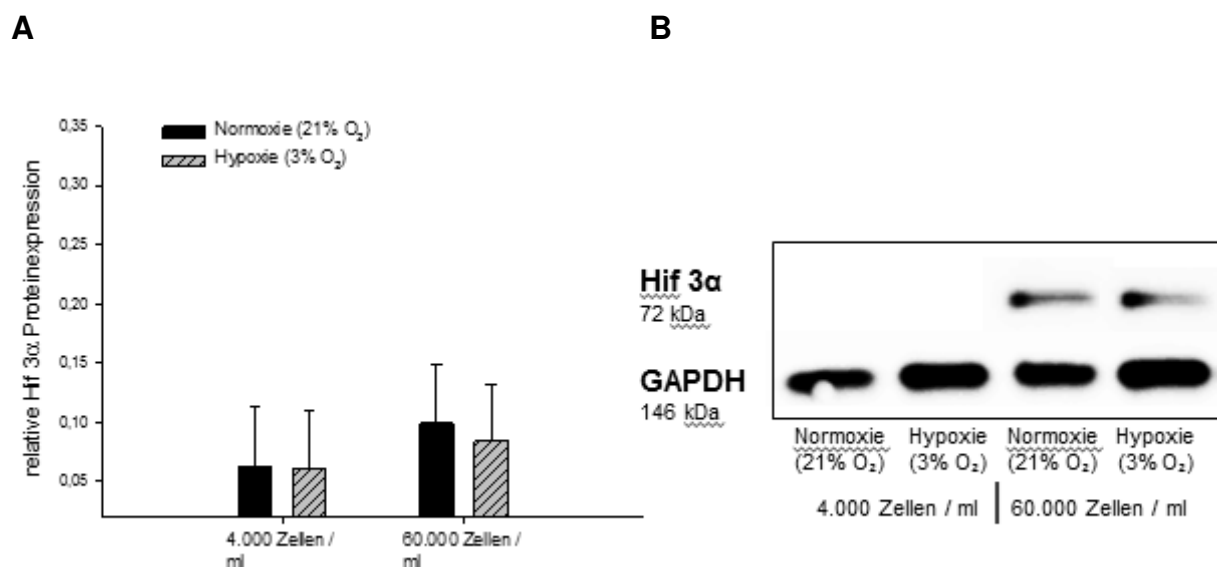


Abb. 30: **Tendenziell erhöhte relative Proteinexpression von Hif 3 α durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml):** (A) Graphische Darstellung der relativen, gegen GAPDH normalisierten Proteinexpression mittels Western Blot, $n = 3$, Daten dargestellt als $MW \pm SEM$, (B) Repräsentative Western Blot Banden von Hif 3 α

7.4.2.2 Wirkung von chemischer Hypoxie mittels DFX und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) auf die mRNA-Expression von Hif 1 α in hASCs

Zur Verifizierung des Einflusses von chemischer Hypoxie und ROS auf den Signalfaktor Hif 1 α in hASCs, wurden die Zellen jeweils standardisiert für drei Tage in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) mit 200 μ M DFX und 250 nM H₂O₂ inkubiert und die relative mRNA-Expression von Hif 1 α gemessen. In der Kontrolle wurden hASCs drei Tage in hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) mit unbehandeltem Medium kultiviert. Die relative mRNA-Expression von Hif 1 α war hierbei durch DFX im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. H₂O₂ senkte das Hif 1 α -Levels tendenziell, aber nicht signifikant (Abb. 31).

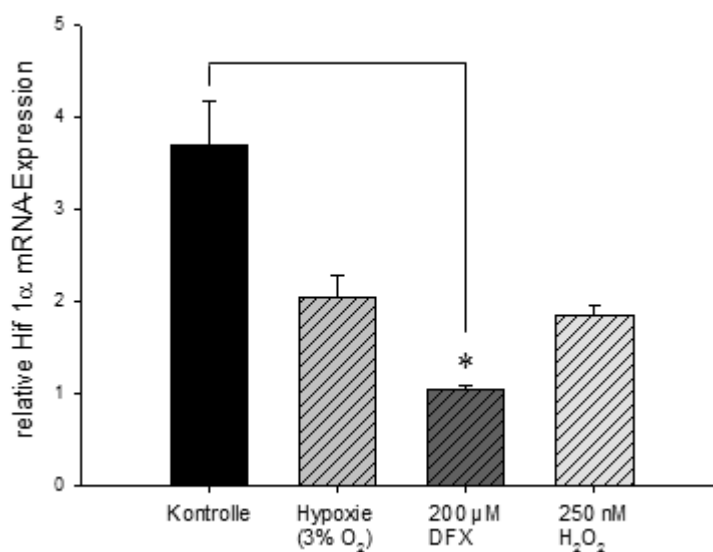


Abb. 31: **Signifikant erniedrigte relative mRNA-Expression von Hif 1 α durch chemische Hypoxie mittels 200 μ M DFX:** Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, $n = 4$, Daten dargestellt als $MW \pm SEM$, * entspricht $p < 0,05$

7.4.3 Connexine als Transmembranproteine zur Kommunikation zwischen Zellen in hASCs

7.4.3.1 Wirkung von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von GJA1 in hASCs

Um die Wirkung von Zelldichte, als weiteren entscheidenden Einflussfaktor auf isolierte hASCs zu verstehen, wurden diese in ansteigender Zelldichte von 4.000 bis 60.000 Zellen / ml Medium sowie jeweils unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (3% O₂) drei Tage kultiviert. Daraufhin wurde die mRNA-Expression von GJA1, dem kodierenden Gen für Cx43, analysiert. Es zeigte sich, dass unter hypoxischen Bedingungen mit 3% Sauerstoffgehalt in Kombination mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) die relative mRNA-Expression von GJA1 im Vergleich zur niedrigeren (4.000 Zellen / ml) und mittleren Zelldichte (15.000 Zellen / ml) unter Hypoxie (3% O₂) signifikant anstieg. Dieser Effekt konnte unter Normoxie (21% O₂) nur tendenziell nachgewiesen werden. Hypoxie (3% O₂) alleine führte nur bei mittlerer (15.000 Zellen / ml) und hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) zu einem Anstieg (Abb. 33 A). In der Immunocytochemie (ICC) konnte eine deutliche Zunahme der Aktivität von Cx43 unter Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) nachgewiesen werden. Die alleinige Zunahme der Zelldichte führte zu einem geringen Anstieg der Cx43-Aktivität bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) verglichen mit niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml). Die Inkubation unter Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) zeigte keine Aktivitätszunahme von Cx43 (Abb. 33 B). In den Western Blot Analysen zeigten sich analoge Ergebnisse. Ein deutlicher Anstieg der Proteinaktivität von Cx43 wurde unter Hypoxie (3% O₂) kombiniert mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) gemessen. Hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Normoxie (21% O₂) zeigte eine höhere Aktivität von Cx43 im Vergleich zu niedrigerer Zelldichte (4.000 Zellen / ml) unter Normoxie (21% O₂). Allerdings schien die Aktivitätszunahme von Cx43 bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) unter Hypoxie (3% O₂) hier markanter zu sein (Abb. 33 C).

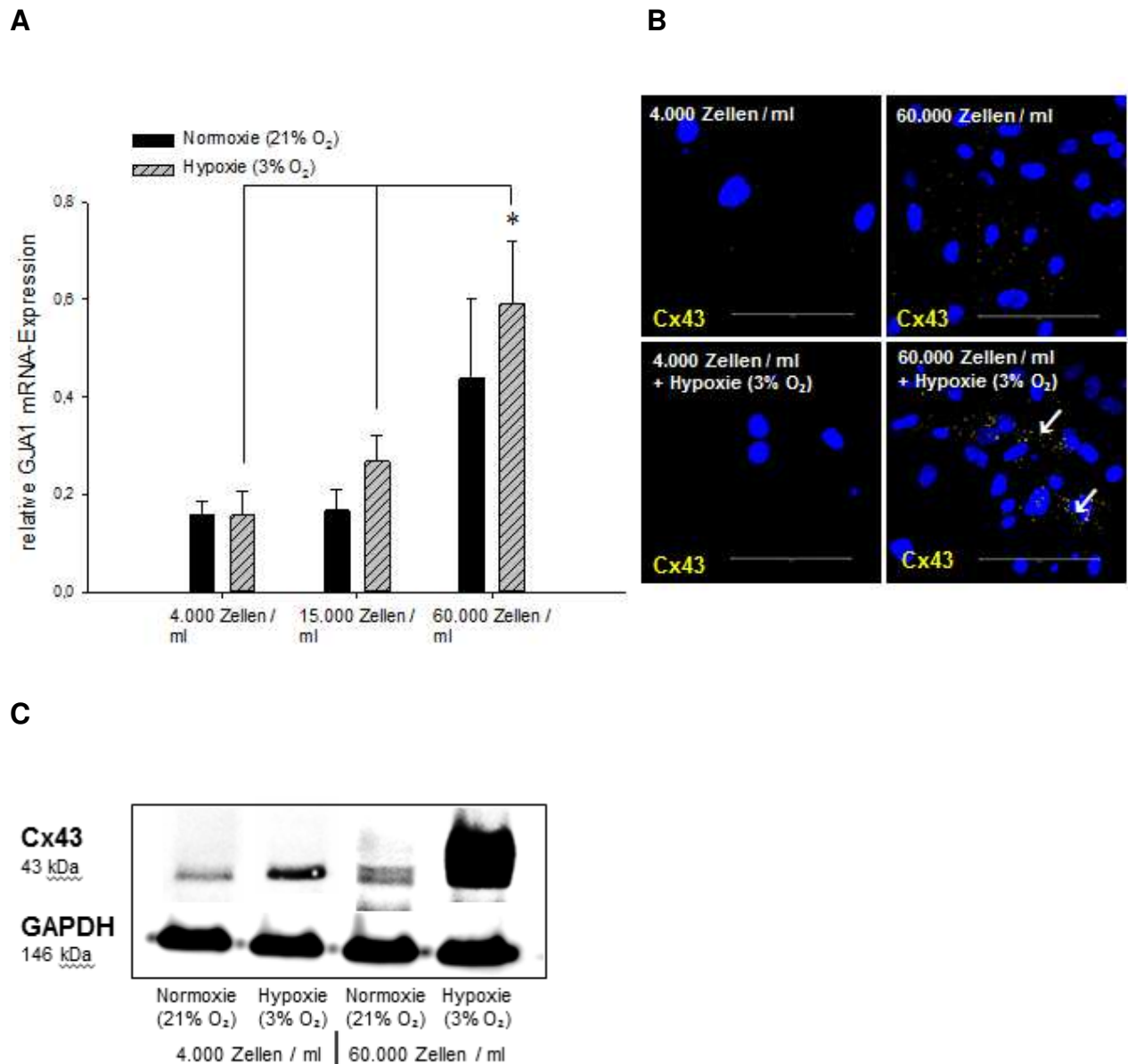


Abb. 33: **Signifikant erhöhte relative mRNA-Expression von GJA1 unter Hypoxie (3% O₂) kombiniert mit steigender Zelldichte:** (A) Graphische Darstellung der relativen, gegen GUSB normalisierten mRNA-Expression mittels *real-time* PCR, n = 4, Daten dargestellt als MW ± SEM, * entspricht p < 0,05, (B) Repräsentative Immunocytochemie (ICC) von Cx43 (gelb), Zellkern mit DAPI markiert (blau), Pfeil markiert Cx43, Massstab = 100 µm, (C) Repräsentative Western Blot Banden von Cx43

7.4.4 Untersuchung der Wirkung von Inkubationsbedingungen auf hASCs

Um sicherzustellen, dass die isolierten hASCs durch die verwendeten Substanzen und Inkubationsbedingungen nicht geschädigt wurden, erfolgte mit Hilfe von Ethidium-Homodimer-2 (EthD-2) unter den genannten Bedingungen eine Bestimmung der Zellvitalität. Dauer, Konzentration und Zelldichte entsprachen dabei den jeweiligen

standardisierten Versuchsansätzen. Bei unterschiedlicher Inkubationsdauer wurde die relative Anzahl EthD-2 positiver Zellen unter der längsten angewandten Inkubationsdauer geprüft. Als Positivkontrolle wurde Methanol/Aceton verwendet. Zudem wurde eine standardisierte Negativkontrolle analysiert. Sowohl unter Hypoxie (3% O₂), chemischer Hypoxie durch 200 µM DFX als auch während der Inkubation mit 200 nM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) war kein signifikant erhöhte Anzahl an EthD-2 positiven Zellen nachweisbar (Abb. 34).

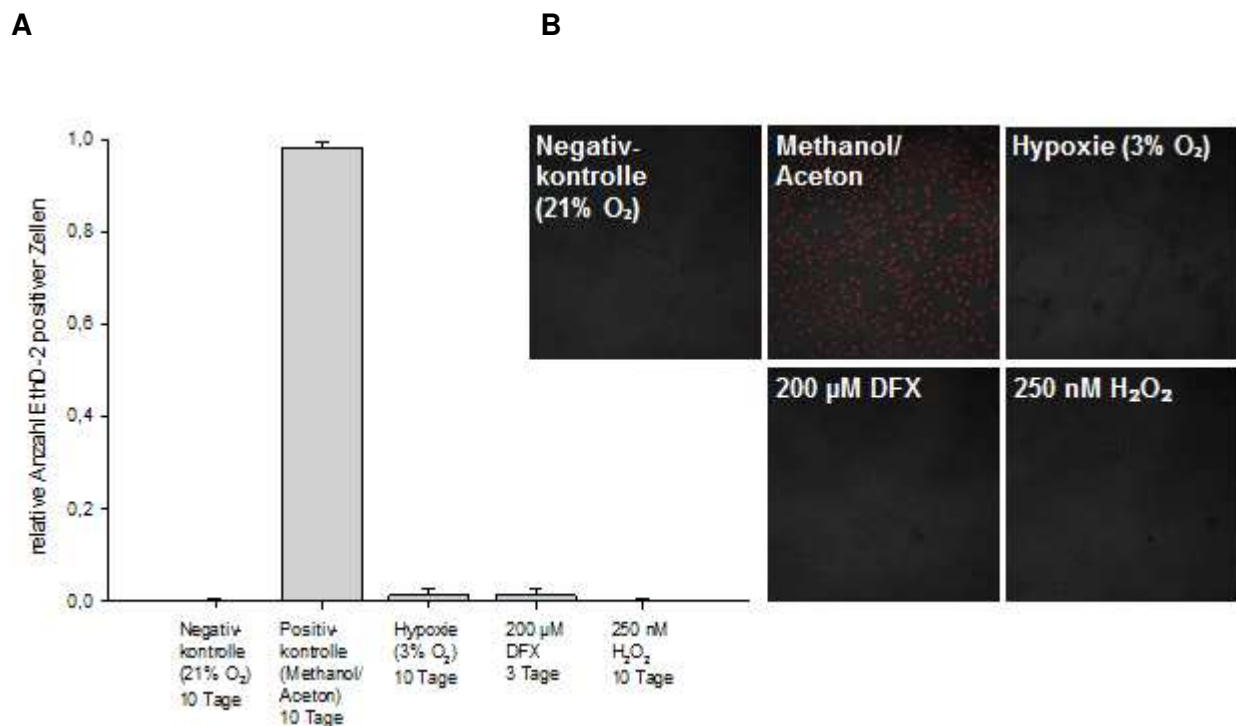


Abb. 34: **Keine signifikant erhöhte Anzahl an EthD-2 positiven Zellen durch Hypoxie (3% O₂), chemischer Hypoxie mittels 200 µM DFX und 250 nM H₂O₂:** (A) Quantitative Analyse der relativen Anzahl EthD-2 positiver Zellen, n = 3, Daten dargestellt als MW ± SEM, (B) Repräsentative Immunocytochemie (ICC) von toten Zellen mit EthD-2 (rot), Massstab = 100 µm

8 Diskussion

8.1 Charakterisierung der mesenchymalen Oberflächenmarker in hASCs

Der Phänotyp von humanen fettabgeleiteten Stammzellen ist nahezu identisch zu dem von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (Pittenger et al. 1999). Beide Zelltypen exprimieren Proteine für die gleichen Adhäsions- und Rezeptormoleküle (Pittenger et al. 1999). Es wurden die Oberflächenmarkercharakteristika von isolierten hASCs nachgewiesen und diese über mehrere Passagen beobachtet, um gleiche und standardisierte Bedingungen bei der Arbeit mit Stammzellen aus humanem Fettgewebe zu garantieren. HASCs zeigten über alle Passagen ein für mesenchymale Stammzellen typisches Profil an Oberflächenmarker. Speziell waren sie positiv für CD73, CD90, CD105 und CD166, typischen Markern zum Nachweis multilinearen Differenzierungspotentials (Gimble et al. 2007, Gronthos et al. 2001, Mitchell et al. 2006, Pittenger et al. 1999). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass isolierte hASCs positiv für das β 1-Integrin CD29 und den Hyaluronat-Rezeptor CD44 waren (Gimble et al. 2007, Mitchell et al. 2006). Demgegenüber waren hASCs negativ für hämatopoetische und endotheliale Oberflächenmarker, wie CD31, CD34 und CD133 (Gimble et al. 2007). Mitchell et al. fanden heraus, dass erst ab Passage drei bis vier typische mesenchymale Marker in hASCs exprimiert werden, während in der *Stromal Vascular Fraction (SVF)* CD34 noch stark exprimiert wird (Mitchell et al. 2006). Diese Ergebnisse korrelieren mit den erhobenen Daten. In der vorliegenden Arbeit wurden die Oberflächenantigene ab Passage drei analysiert und typische Expressionen der Immunophenotypen entsprechend der Analysen von Mitchell et al. gefunden. Für CD34 waren die Zellen bereits negativ. Aus Fettabsaugungen gewonnene hASCs zeigten im Vergleich zu hASCs aus chirurgischen Eingriffen eine höhere Anzahl an CD34 positiven Zellen, was vermutlich in der unterschiedlichen Isolationstechnik zu begründen war (Bekhite et al. 2014). Zudem war es bei hASCs aus chirurgischen Eingriffen leichter mögliche Kontaminationen mit CD31 und CD34 positiven Zellen durch die initiale Entfernung der Gefäßstrukturen vor der enzymatischen Dissoziation zu reduzieren. Aus diesen Gründen wurden nur hASCs aus chirurgisch entferntem Fettgewebe verwendet.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die isolierten hASCs aus Patientenproben entnommen im Rahmen von Operationen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie im Universitätsklinikum Jena als Stammzellen der mesenchymalen Stammzellreihe charakterisiert werden. Die mesenchymalen Oberflächencharakteristika blieben zudem über zwölf Passagen hinweg stabil.

8.2 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 in hASCs

Die Daten zeigten eine nahezu stabile mRNA-Expression der embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 sowie des Proliferationsmarkers Rex-1 in hASCs, wenn diese unter standardisierten Kultivierungsbedingungen über mehrere Passagen inkubiert wurden. Unter dem Einfluss der physiologischen Faktoren Zelldichte und Hypoxie stieg vor allem die relative mRNA-Expression von Sox-2 nach drei Tagen Kultivierung signifikant, wenn hASCs unter definierter Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 3% und gleichzeitiger hoher Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml kultiviert wurden. Weiterhin stieg die relative Sox-2-mRNA-Expression signifikant, wenn hASCs bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) für drei Tage zusätzlich unter Hypoxie von 3% inkubiert wurden. Bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) zeigte sich also ein höherer Einfluss von Hypoxie (3% O₂) auf die relative mRNA-Expression von Sox-2. Bei Betrachtung der mittleren Zelldichte (15.000 Zellen / ml) waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen. Wenn man die gemessenen Werte bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Normoxie (21% O₂) und unter Hypoxie (3% O₂) mit denen bei niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) verglich, war die relative mRNA-Expression von Sox-2 erneut signifikant erhöht. Es zeigte sich bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) ein zunehmender Einfluss der Zelldichte auf die relative mRNA-Expression von Sox-2 in hASCs. In den immunocytochemischen Untersuchungen konnte eine erhöhte Proteinexpression von Sox-2 bei hoher Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml gemessen werden, welche jedoch im Gegensatz zur PCR unter Normoxie (21% O₂) größer war als unter Hypoxie (3% O₂). Vermutlich kam es hierbei zu Gegenregulationsmechanismen in der Zelle oder diese Abweichung muss als Fehler in der Methode gewertet werden. Die relativen mRNA-Expressionen der embryonalen Gene NANOG und Oct3/4 stiegen dagegen nur tendenziell, aber nicht signifikant durch den Einfluss von hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) und Hypoxie (3% O₂). Eine Erhöhung der Expositionsdauer unter

Hypoxie (3% O₂) von drei auf zehn Tage zeigte keinen weiteren Effekt. Durch chemische Hypoxie mittels DFX ließ sich eine ähnliche Wirkung verglichen mit Hypoxie durch reduzierten Sauerstoffgehalt erzielen. Die relative mRNA-Expression von Rex-1 fiel durch DFX sogar signifikant stärker ab. Allerdings war die relative mRNA-Expression von NANOG durch DFX im Gegensatz zu Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt signifikant reduziert. Hierbei könnte eine unterschiedliche Regulation der embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 durch verschiedene Einflussfaktoren vermutet werden. Andere experimentelle Studien fanden heraus, dass durch Hypoxie mit 2% Sauerstoffgehalt humane embryonale und mesenchymale Stammzellen in undifferenziertem Stadium stabilisiert wurden und embryonale Gene, vor allem Oct3/4 anstiegen (Grayson et al. 2007, Simon und Keith 2008). Eine aktuelle Studie von Fotia et al. zeigte 2014 eine Erhöhung der embryonalen Gene NANOG und Sox-2 durch Hypoxie von 1% Sauerstoff in hASCs (Fotia et al. 2014). Heneidi et al. isolierten eine spezielle stressresistente Zelllinie ausgehend von hASCs und zeigten, dass zellstressauslösende Kulturbedingungen, wie verlängerte Inkubation in Kollagenase, vermindertes Medium, erniedrigte Temperaturen und Hypoxie zu erhöhter Expression von NANOG, Sox-2 und Oct3/4 führten (Heneidi et al. 2013). Einige Studien wiesen in diesem Zusammenhang bereits das verbesserte Überleben von humanen embryonalen und mesenchymalen Stammzellen durch Hypoxie-präkonditionierung in ischämischen Milieu *in vitro* nach (Abdollahi et al. 2011, Csete 2005, Grayson et al. 2007). Bezüglich des Einflusses von Zelldichte auf embryonale Gene in hASCs fanden Kim et al. heraus, dass bei hohen Zelldichten von 5.000 Zellen pro cm² Zellkommunikations- und Signaltransduktionsgene erhöht exprimiert wurden (Kim et al. 2014). Auch Gage et al. beschrieben den bedeutenden Einfluss von unterschiedlichen Zelldichten auf die Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen (Gage et al. 2013). Bisher gab es allerdings kaum Studien, die den Einfluss von Zelldichte auf hASCs untersuchten.

Neben der Pluripotenz wird auch die Proliferation von humanen embryonalen, hämatopoetischen, mesenchymalen und neuronalen Stammzellen über den Sauerstoffgradienten reguliert (Ezashi et al. 2005, Mohyeldin et al. 2010). Im Gegensatz zu dem Einfluss von Zelldichte und Hypoxie auf Stammzellgene bewirkten dieselben Faktoren eine signifikante Reduzierung der relativen mRNA-

Expression des Proliferationsfaktors Rex-1. Durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) sowohl unter Normoxie (21% O₂) als auch unter Hypoxie (3% O₂) wurde die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant herabreguliert. Der Einfluss von Zelldichte schien hierbei größer zu sein als der Einfluss durch Hypoxie. In der Literatur existierten hierzu unterschiedliche Meinungen. Hogel et al. beschrieben eine verminderte Proliferation von Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf- und Halsregion unter Hypoxie von 1% O₂ (Hogel et al. 2011), während Grayson et al. eine erhöhte Proliferationsrate bei humanen mesenchymalen Stammzellen unter Hypoxie von 2% O₂ fanden (Grayson et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings zusätzlich mit zunehmender Zelldichte gearbeitet. Alleinige Hypoxie (3% O₂) führte bei niedriger Zelldichte von 4.000 Zellen pro ml zu einer erhöhten relativen mRNA-Expression des Proliferationsmarkers Rex-1. Erst durch erhöhte Zelldichte (60.000 Zellen / ml) nahm der Einfluss der Zelldichte zu und die relative mRNA-Expression von Rex-1 sank signifikant. Kim et al. zeigten kürzlich, dass Proliferationsgene in hASCs erhöht exprimiert wurden, wenn die Zellen in niedriger Zelldichte von 200 Zellen pro cm² über 7 Tage kultiviert wurden (Kim et al. 2014). Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit.

Wenn man die erhobenen Daten bis hierhin zusammenfassend betrachtet, konnte den isolierten hASCs ein grundlegender und belegt durch die signifikante Erhöhung des Stammzellgens Sox-2 und die signifikante Reduzierung des Proliferationsmarkers Rex-1 beeinflussbarer Stammzellcharakter nachgewiesen werden. Vermittelt wurden diese Effekte durch den reduzierten Sauerstoffgehalt auf 3% (Hypoxie) und eine hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml.

8.3 Einfluss von ROS auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 in hASCs

Zudem zeigte sich, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) Einfluss auf die embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 und den Proliferationsmarker Rex-1 nahmen. Durch die täglich wiederholte Inkubation von hASCs mit H₂O₂ über zehn Tage stieg die relative mRNA-Expression von NANOG und Oct3/4 signifikant. Auch die relative mRNA-Expression von Sox-2 war durch H₂O₂-Exposition tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Gleichzeitig wurde die relative mRNA-Expression von Rex-1 signifikant herabreguliert. In Versuchen zur Zellvitalität wurde nachgewiesen, dass die Inkubation mit H₂O₂ zu keinen toxischen Effekten in hASCs führte. Eine

experimentelle Studie von Dentelli et al. zeigte, dass die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Expression von NANOG und Oct3/4 in einem diabetischem Milieu in hASCs hochreguliert wurden (Dentelli et al. 2013). Hierbei ist eine Adaptation der Zellen an den oxidativen Stress als Ursache zu vermuten. Diese Daten korrelieren mit den gemessenen Ergebnissen. Es ist möglicherweise davon auszugehen, dass hASCs grundlegend ROS durch Hypoxie, wie sie unter anderem in diabetischem Milieu auftritt, generieren und dadurch Effekte auf embryonale Gene vermittelt werden, wie sie auch durch sekundär zugeführte ROS zu beobachten sind. Durch das Antioxidans Ascorbinsäure wurde in einer anderen Studie eine Reduktion der Gene NANOG und Sox-2 in hASCs bewirkt (Sun et al. 2013). Zudem wiesen Kim et al. 2012 nach, dass in hASCs unter Hypoxie (2% O₂) durch die NADPH-Oxidase 4 (Nox4), welche sich in der Nähe von Mitochondrien befindet, ROS gebildet wurden. Dies führte wiederum zu einer Hochregulierung von Oct3/4 und Rex-1 (Kim et al. 2012). Passend hierzu stieg auch in den erhobenen Daten die relative mRNA-Expression von Oct3/4 signifikant durch ROS. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expression von Rex-1 durch H₂O₂ nachgewiesen werden. In anderen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die relative mRNA-Expression von Rex-1 durch alleinige Hypoxie erhöht war und erst durch zusätzliche hohe Zelldichte signifikant reduziert wurde. Offenbar ist, neben durch Hypoxie generierten ROS, die zusätzliche sekundäre Zufuhr von ROS oder weitere mögliche ROS-generierende Faktoren wie möglicherweise hohe Zelldichte nötig. Reaktive Sauerstoffspezies beeinflussen hASCs in ähnlicher Art und Weise wie Hypoxie (Fraisl et al. 2009). Verglichen mit Hypoxie (3% O₂) stiegen bei den erhobenen Daten die relativen mRNA-Expressionen der embryonalen Gene NANOG und Oct3/4 signifikant und Sox-2 tendenziell durch die Inkubation mit H₂O₂, während durch Hypoxie mit reduziertem Sauerstoffgehalt die relative mRNA-Expression von Sox-2 signifikant und NANOG und Oct3/4 tendenziell stiegen. Die relative mRNA-Expression von Rex-1 wurde sowohl durch Hypoxie (3% O₂) als auch H₂O₂ signifikant reduziert. Der Anstieg unter H₂O₂ war allerdings erst nach zehn Tagen Expositionsdauer zu verzeichnen, war dann aber größer als unter Hypoxie (3% O₂). Da der Einfluss von Zelldichte in den vorher beschriebenen Experimenten bei hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) am größten war, wurden in den Versuchen mit H₂O₂ ausschließlich hohe Zelldichten von 60.000 Zellen pro ml verwendet.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ROS eine vergleichbare Wirkung wie Hypoxie auf embryonale Gene und den Proliferationsmarker Rex-1 in isolierten hASCs haben. Diese Tatsache ist möglicherweise durch die Generierung von ROS vermittelt durch Hypoxie in hASCs zu erklären.

8.4 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von PHD3 in hASCs

Um im Ansatz verstehen zu können, wie hASCs unter diesen analysierten Bedingungen den reduzierten Sauerstoffgehalt und die Zelldichte wahrnehmen konnten, analysierten wir die relative mRNA-Expression der verschiedenen PHD-Isoformen PHD1, PHD2 und PHD3. Die vorliegenden Daten zeigten deutlich, dass vor allem PHD3 in hASCs grundlegend exprimiert und durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) zusammen mit reduziertem Sauerstoffgehalt auf 3% signifikant hochreguliert wurde. Hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) unter Normoxie (21% O₂) zeigte allerdings keine signifikanten Veränderungen der relativen mRNA-Expression von PHD3. Der Einfluss von Hypoxie (3% O₂) war hierbei entscheidender. Chemische Hypoxie vermittelt durch DFX zeigte auch hier vergleichbare Effekte wie Hypoxie durch reduzierten Sauerstoffgehalt. Die relative mRNA-Expression von PHD3 stieg durch chemische Hypoxie signifikant und sogar stärker verglichen mit Hypoxie durch 3% Sauerstoffgehalt. Die Prolyl Hydroxylase PHD2 sowie HIF1AN zeigten keine signifikanten Veränderungen, während PHD1 nicht nachweisbar war. Hogel et al. wiesen eine Hochregulation von PHD3 durch Hypoxie (1% O₂) in Plattenepithelkarzinomzellen der Kopf- und Halsregion nach, welche für das Zellüberleben durch vermindertes Sauerstoffangebot entscheidend ist (Hogel et al. 2011). Selbst wenn nur ein Teil der Zellen PHD3 exprimieren, haben eine größere Zahl der Zellpopulation hiervon einen Benefit in Bezug auf das Zellüberleben (Hogel et al. 2011). Eine Überexpression von PHD3 unter Normoxie führte wiederum zum apoptotischen Zelltod in neuronalen Zellen (Lee et al. 2005), sodass Hogel et al. PHD3 eine duale Funktion je nach Zelltyp und Sauerstoffversorgung zuschreiben (Hogel et al. 2011). Zudem vermuten Ginouves et al. die Erhöhung der Expression von PHD3 unter Hypoxie als adaptiven Mechanismus zum Schutz vor Apoptose und Zelltod (Ginouves et al. 2008).

Die vorliegenden Versuche ergaben zudem, dass die relative mRNA-Expression von PHD3 in isolierten hASCs sensitiv auf den umgebenden Sauerstoffgehalt reagierte. Durch Kultivierung von hASCs unter Hypoxie (3% O₂) und anschließender Normoxie (21% O₂), fiel die zunächst erhöhte relative mRNA-Expression von PHD3 erneut ab. Es zeigte sich eine potentielle Umkehrbarkeit der erzielten Effekte von Hypoxie auf die relative mRNA-Expression von PHD3. HASCs scheinen demnach über die Erhöhung der Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3) die Sauerstoffkonzentration in ihrer Umgebung wahrzunehmen und über die Modulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors Hif 1 α darauf zu reagieren. Zu diesem Ergebnis kam auch Semenza (Semenza 2011). PHD3 wird in diesem Zusammenhang als wichtiger Modulator von Hif 1 α während der Reaktion auf niedrige Sauerstofflevel beschrieben (Appelhoff et al. 2004).

ROS, vermittelt durch H₂O₂ alleine, zeigten in diesem Versuch keinen Effekt auf die relative mRNA-Expression von PHD3. Wie bereits vermutet können offenbar H₂O₂ und andere ROS durch Hypoxie in hASCs generiert werden und erzielen ähnliche Effekte wie sekundär zugeführte ROS, jedoch wird die Wirkung möglicherweise über unterschiedliche Mechanismen in der Zelle vermittelt. Dies würde bedeuten, dass bei der Regulation von Effekten durch ROS andere Faktoren, möglicherweise andere Isoformen der Prolyl Hydroxylasen, stärkeren Einfluss nehmen. Hagen vermutete in diesem Zusammenhang 2012, dass die Wirkung von Hypoxie und durch Mitochondrien generierte ROS auf Zielgene von Hif zwar ähnlich ist, aber durch verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt wird. Während Hypoxie vorwiegend über Prolyl Hydroxylasen reguliert wird, werden die Effekte von H₂O₂ durch den *Factor Inhibiting HIF* (FIH), auch bekannt als HIF1AN vermittelt (Hagen 2012).

Schlussfolgernd konnten gezeigt werden, dass speziell die relative mRNA-Expression der Isoform PHD3 der Prolyl Hydroxylasen in isolierten hASCs entscheidend durch Hypoxie mit dreiprozentigem Sauerstoffgehalt in Kombination mit hoher Zelldichte von 60.000 pro ml und durch chemische Hypoxie vermittelt durch DFX signifikant hochreguliert wurde, während die Effekte von H₂O₂ als Vertreter von ROS möglicherweise über andere Mechanismen reguliert wurden.

8.5 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf die mRNA-Expression von Hif 1α in hASCs

Hypoxie-induzierbare Faktoren wie Hif 1α werden in der Literatur als weitere entscheidende Bestandteile in der Vermittlung von Hypoxie in hASCs beschrieben (Masson und Ratcliffe 2003). hASCs wurden unter hypoxischen Bedingungen (3% O₂) inkubiert und die relative mRNA-Expression von Hif 1α gemessen. Interessanterweise wurde die relative mRNA-Expression von Hif 1α signifikant herabreguliert, wenn hASCs unter Hypoxie (3% O₂) in Kombination mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) kultiviert wurden. Unter vergleichbaren standardisierten Kultivierungsbedingungen wurde die relative mRNA-Expression von Hif 1α also gegenläufig zu PHD3 reguliert. Die Analysen der Proteinexpression von Hif 1α mittels Western Blot zeigten ähnliche Ergebnisse. Durch Hypoxie (3% O₂) kombiniert mit hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) sank die Aktivität von Hif 1α, wobei hier hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml einen größeren Einfluss hatte. Der Einfluss von chemischer Hypoxie vermittelt durch DFX auf die relative mRNA-Expression von Hif 1α war auch hier analog zu den Effekten von Hypoxie durch reduzierten Sauerstoffgehalt von 3%. Unter chemischer Hypoxie war die relative mRNA-Expression von Hif 1α signifikant reduziert, in stärkerem Masse als durch Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt. In der Literatur waren hierzu kontroverse Angaben zu finden. Es wurde in einer Studie von Appelhoff et al. gezeigt, dass die relative mRNA-Expression und Proteinaktivität von Hif 1α und Hif 2α durch experimentelle Hypoxie hochreguliert werden kann (Appelhoff et al. 2004). Forristal et al. sehen die Bedeutung von Hif 1α in der initialen Adaption an Hypoxie, während die verzögerte Antwort auf Hypoxie durch Hif 2α aufrechterhalten wird. Sie wiesen zudem nach, dass die Proteinexpression von Hif 1α unter Normoxie nicht stillgelegt war (Forristal et al. 2010). Diese Ergebnisse korrelieren teilweise mit den vorliegenden Daten. Vermutlich ist nach drei Tagen Hypoxie die initiale Phase der Anpassung bereits überschritten, sodass Hif 1α in den erhobenen Daten bereits wieder erniedrigt war. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit die Proteinexpression von Hif 1α unter Normoxie nachgewiesen werden. Die Expression von Hif 1α unter Normoxie ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass sich Hif 1α unter Normoxie im Zytoplasma befindet und somit nachgewiesen werden kann (Kallio et al. 1998). Li et al. konnten zeigen, dass Hif 1α auf mRNA-Ebene nach zwei Stunden herabreguliert und auf Proteinebene zunächst von zwei bis vier Stunden hochreguliert und anschließend ab

acht Stunden unter Hypoxie herabreguliert wurde (Li et al. 2006). Dies zeigte erneut, dass die Zeit der Messung entscheidend ist, da Hif 1 α in den ersten Stunden hochreguliert und in den darauffolgenden Stunden herabreguliert wird. Diese Aussagen decken sich mit den erhobenen Daten. Nach drei Tagen Hypoxie waren die relative mRNA-Expression von Hif 1 α signifikant erhöht. Zu diesem Schluss kamen auch andere Studien (Uchida et al. 2004, Wiesener et al. 1998). Eine Stabilisierung von Hif α -Proteinen über Hif α -Transkription verursachte den gleichläufigen Verlauf auf Protein- und mRNA-Ebene (Li et al. 2006). Eine weitere mögliche Erklärung könnte der zusätzliche Einfluss von hoher Zelldichte auf die relative mRNA-Expression von Hif 1 α sein. Zu dieser Vermutung passende Ergebnisse konnten wir mittels *real-time* PCR und Western Blot von Hif 1 α nachweisen. Unter hoher Zelldichte (60.000 Zellen / ml) in Kombination mit Hypoxie (3% O₂) sank die relative mRNA-Expression von Hif 1 α signifikant, während sie unter niedriger und mittlerer Zelldichte (4.000 und 15.000 Zellen / ml) kombiniert mit Hypoxie (3% O₂) tendenziell unverändert blieb. Auch in den Western Blot Analysen sank die Aktivität von Hif 1 α am stärksten durch hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml.

Darüber hinaus wurde die Proteinexpression von Hif 3 α in isolierten hASCs gemessen. Dabei zeigte sich in Western Blot Analysen durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) und Hypoxie (3% O₂) eine Hochregulierung der Aktivität von Hif 3 α . Hif 2 α konnte in der vorliegenden Arbeit in Western Blot Analysen nicht nachgewiesen werden. Auch Li et al. wiesen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Hochregulierung von Hif 3 α nach zwei Stunden unter dem Einfluss von Hypoxie in Lungenepithelzellen nach (Li et al. 2006). Weiterhin lassen die erhobenen Daten vermuten, dass die Aktivität von Hif 3 α unter Hypoxie in hASCs steigt, aber unter diesen Bedingungen hemmend auf die Proteinexpression von Hif 1 α wirkt. Zu derselben Erkenntnis kamen auch andere Studien (Hara et al. 2001, Li et al. 2006). Zudem beschreiben Hu et al. einen hemmenden Effekt von Hif 3 α auf Hif 2 α (Hu et al. 2003).

ROS vermittelt durch die Inkubation mit H₂O₂ führten in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der relativen mRNA-Expression von Hif 1 α . Es ist bekannt, dass Radikalfänger die Expression von Hif 1 und 3 α vermindern, was die entscheidende Rolle von Mitochondrien und deren Bildung von ROS in dem

komplexen Prozess der Sauerstoffwahrnehmung erneut betont (Hu et al. 2003, Li et al. 2006).

PHD3 wurde bereits als wichtiger Modulator von Hif 1 α während der Reaktion auf niedrige Sauerstofflevel hervorgehoben (Appelhoff et al. 2004). Hif 1 α beeinflusst wiederum über einen negativen Feedbackmechanismus die Expression von PHD3 (Pescador et al. 2005). PHD3 und Hif 1 α scheinen demnach co-regulatorische Faktoren bezüglich Hypoxie und Zelldichte zu sein.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die relative mRNA-Expression von Hif 1 α durch Hypoxie (3% O₂), hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml, wie auch chemische Hypoxie vermittelt durch DFX und H₂O₂ signifikant herunterreguliert wurde. Zudem kann eine entscheidende wechselseitige Beeinflussung von Hif 1 α und PHD3 angenommen werden.

8.6 Einfluss von Hypoxie (3% O₂) und Zelldichte auf Connexine

Die Expression von Connexin 43 konnte in der vorliegenden Arbeit an der Zelloberfläche von hASCs nachgewiesen werden. Wong et al. konnten Cx43 und Cx45 in humanen embryonalen Stammzellen nachweisen (Wong et al. 2004). Connexine scheinen eine wichtige Rolle bezüglich Differenzierung und Zellüberlebens in humanen embryonalen Stammzellen zu spielen. Es ist bekannt, dass der Kontakt zwischen Zellen durch Connexine vermittelt wird (Bruzzone et al. 1996). Die Dissoziation von hESCs zu einzelnen Zellen führte zum Zelltod, der durch die fehlende Kommunikation über *gap junctions* begründet sein könnte (Wong et al. 2004). Eine Erhöhung von Connexinen induzierte eine Hemmung des Zellwachstums (Loewenstein und Rose 1992). Es wurde gezeigt, dass mit zunehmender Zelldichte die relative mRNA-Expression von GJA1 (Cx43) zunimmt und durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) in Kombination mit Hypoxie (3% O₂) sogar signifikant gegenüber niedriger Zelldichte (4.000 Zellen / ml) kombiniert mit Hypoxie anstieg. In den immunocytochemischen Untersuchungen konnten analoge Ergebnisse nachgewiesen werden. Die Proteinexpression von Cx43 war hierbei durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) kombiniert mit Hypoxie (3% O₂) deutlich erhöht. Die Ergebnisse korrelieren mit Daten aus anderen Studien. Grayson et al. wiesen in diesem Zusammenhang eine Erhöhung von Cx43 unter Hypoxie von 2% O₂ in humanen mesenchymalen Stammzellen nach (Grayson et al. 2007). Möglicherweise können

Zellen im engen Zellverband vergleichen mit Zellen in niedriger Zelldichte über den Austausch von Signalen über Connexine Veränderungen der Umgebungsbedingungen besser tolerieren und darauf reagieren. Dies würde im Sinne von Anpassungsmechanismen unter Hypoxie (3% O₂) den signifikanten Anstieg von PHD3 und Abfall von Hif 1 α erklären. Diese Aussagen passen zudem zu der Hypothese von Trosko et al., welche vermuten, dass im Verlauf der Embryonalentwicklung aus einer einzelnen Zygote ohne Connexine multipotente Zellverbände mit Expression von Connexinen entstehen und darüber eine verbesserte Anpassung an Umweltbedingungen gegeben ist (Trosko et al. 2000). Li et al. zeigten einen Anstieg der Expression von Hif 1 und 3 α durch Erhöhung der Zelldichte (Li et al. 2006). Humane embryonale Stammzellen unterliegen im Zellverband einer Kontakthemmung, die die ungehinderte Proliferation und Differenzierung hemmt (Trosko et al. 2000).

Zhu et al. wiesen darüber hinaus nach, dass die Expressionen von NANOG, Sox-2, Oct3/4 und Rex-1 signifikant anstiegen, wenn hASCs nicht bei 99% Konfluenz, sondern erst bei überlappendem Wachstum subkultiviert wurden (Zhu et al. 2008). Dieses Ergebnis korreliert teilweise mit den erhobenen Daten, da die mRNA-Expression von Sox-2 signifikant durch hohe Zelldichte (60.000 Zellen / ml) anstieg. Im Vergleich dazu wurde ein signifikanter Abfall der relativen mRNA-Expression des Proliferationsmarkers Rex-1 gefunden. Es ist allerdings nachvollziehbar, dass die relative mRNA-Expression von Rex-1 durch hohe Zelldichten abnimmt, da dadurch die Proliferation gehemmt wird.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass speziell Cx43 in isolierten hASCs durch hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml und Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt signifikant hochreguliert wurde.

9 Schlussfolgerungen

Die Beobachtungen und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollten klären, inwieweit die embryonalen Gene NANOG, Sox-2 und Oct3/4 und der Proliferationsfaktor Rex-1 in isolierten humanen fettabgeleiteten Stammzellen (hASCs) durch definierte Hypoxie, Zelldichte und weitere Faktoren wie chemische Hypoxie und ROS beeinflusst wurden und verdeutlichten damit anschaulich den Einfluss eines reduzierten Sauerstoffpartialdrucks auf hASCs. Die erhobenen Daten zeigten zudem ansatzweise die Mechanismen innerhalb der Zelle zur Wahrnehmung eines reduzierten Sauerstoffgehalts.

Das nachgewiesene Expressionsmuster für Oberflächenmarker der mesenchymalen Stammzellreihe in isolierten hASCs und die relativ konstante Expression von embryonalen Genen und des Proliferationsmarkers Rex-1 im Verlauf der Passagen waren dabei Voraussetzung, um einheitliche Bedingungen zu garantieren.

PCR Analysen und immunocytochemischen Untersuchungen zeigten eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Expression und Proteinexpression von Sox-2 durch Kultivierung der hASCs in hoher Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml kombiniert mit Hypoxie von 3% Sauerstoffgehalt. Analoge Bedingungen führten bei Rex-1 zu einer signifikanten Reduktion der relativen mRNA-Expression. Chemische Hypoxie mittels DFX führte zu einer signifikanten Reduktion der relativen mRNA-Expression von Rex-1, allerdings auch zu einer signifikanten Herabregulierung der relativen mRNA-Expression von NANOG. Eine definierte Exposition mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vermittelt durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erhöhte die relativen mRNA-Expressionen der embryonalen Gene NANOG und Oct3/4 signifikant, während die relative mRNA-Expression von Rex-1 auch hier signifikant reduziert wurde.

Der Einfluss von Hypoxie im Allgemeinen wurde dabei vermutlich durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor Hif 1 α und die Prolyl Hydroxylase 3 (PHD3) reguliert. Durch Hypoxie von 3% Sauerstoffgehalt stieg die relative mRNA-Expression von PHD3 signifikant an. Dieser Effekt wurde durch zunehmende Zelldichte bis auf 60.000 Zellen pro ml noch verstärkt. Die relative mRNA-Expression von Hif 1 α fiel dagegen nach Exposition von Hypoxie (3% O_2) in Kombination mit einer hohen Zelldichte

(60.000 Zellen / ml) signifikant ab. Ähnliches zeigte sich bei der Analyse der Proteinexpression von Hif 1 α mittels Western Blot. Chemische Hypoxie durch Inkubation mit DFX wirkte hierbei stärker auf die relative mRNA-Expression von Hif 1 α und PHD3 im Vergleich zu durch Änderung der umgebenden Sauerstoffkonzentration induzierte Hypoxie. H₂O₂ reduzierte in PCR Analysen die relative mRNA-Expression von Hif 1 α in ähnlichem Masse wie Hypoxie durch 3% Sauerstoffgehalt, zeigte jedoch keine Wirkung auf die relative mRNA-Expression von PHD3.

Der Einfluss einer definierten Zelldichte im Allgemeinen wurde in isolierten hASCs über das Connexin 43 vermittelt. In PCR und Western Blot Analysen sowie immuncytochemischen Untersuchungen konnten eine erhöhte relative mRNA-Expression und Proteinexpression von Cx43 durch zunehmende Zelldichte bis auf 60.000 Zellen pro ml nachgewiesen werden. Hierbei wurde der Effekt durch zusätzliche Hypoxie von 3% Sauerstoffgehalt signifikant verstärkt.

Zusammenfassend macht die vorliegende Arbeit deutlich, dass hASCs entscheidend durch Hypoxie und Zelldichte beeinflusst wurden. Hohe Zelldichte von 60.000 Zellen pro ml und Hypoxie mit 3% Sauerstoffgehalt führten zu einer Erhöhung von Stammzellgenen und einer Reduktion des Proliferationsfaktors Rex-1. Dies spricht für den Erhalt des Stammzellpotentials durch diese Faktoren. Chemische Hypoxie vermittelt durch DFX und ROS-Exposition mittels H₂O₂ zeigten ansatzweise vergleichbare Wirkung, wie sie auch nach Applikation von Hypoxie durch Reduzierung des Sauerstoffgehalts beobachtet wurden. Hohe Zelldichte verstärkte die Situation der Sauerstoffmangelversorgung in hASCs. Die Faktoren Hif 1 α , PHD3 und Cx43 waren vermutlich entscheidend an den Regulationsmechanismen dieser Einflussfaktoren in isolierten hASCs beteiligt.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdollahi H, Harris LJ, Zhang P, McIlhenny S, Srinivas V, Tulenko T, DiMuzio PJ. 2011. The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics. *J Surg Res*, 165 (1):112-117.
- Allen RG, Balin AK. 1989. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med*, 6 (6):631-661.
- Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Gleadle JM. 2004. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem*, 279 (37):38458-38465.
- Aprelikova O, Chandramouli GV, Wood M, Vasselli JR, Riss J, Maranchie JK, Linehan WM, Barrett JC. 2004. Regulation of HIF prolyl hydroxylases by hypoxia-inducible factors. *J Cell Biochem*, 92 (3):491-501.
- Ascheim DD, Gelijns AC, Goldstein D, Moye LA, Smedira N, Lee S, Klodell CT, Szady A, Parides MK, Jeffries N, Skerrett D, Taylor DA, Rame JE, Milano C, Rogers JG, Lynch J, Dewey T, Eichhorn E, Sun B, Feldman D, Simari R, O'Gara PT, Taddei-Peters W, Miller MA, Naka Y, Bagiella E, Rose EA, Woo YJ. 2014. Mesenchymal Precursor Cells as Adjunctive Therapy in Recipients of Contemporary LVADs. *Circulation*.
- Bekhite MM, Finkensieper A, Rebhan J, Huse S, Schultze-Mosgau S, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. 2014. Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 23 (4):333-351.
- Ben-Shushan E, Thompson JR, Gudas LJ, Bergman Y. 1998. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*, 18 (4):1866-1878.
- Birket MJ, Casini S, Kosmidis G, Elliott DA, Gerencser AA, Baartscheer A, Schumacher C, Mastroberardino PG, Elefanty AG, Stanley EG, Mummery CL. 2013. PGC-1 α and Reactive Oxygen Species Regulate Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Function. *Stem Cell Reports*, 1 (6):560-574.
- Blasiak J, Szaflik JP. 2011. DNA damage and repair in age-related macular degeneration. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16:1291-1301.
- Bolanos JP, Medina JM. 1996. Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *J Neurochem*, 66 (5):2091-2099.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122 (6):947-956.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. 1996. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 238 (1):1-27.
- Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95 (20):11715-11720.
- Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, Morrison WA, Dilley RJ. 2010. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*, 14 (4):878-889.
- Cohnheim J. 1867. *The British Medical Journal*.
- Connett RJ, Honig CR, Gayeski TE, Brooks GA. 1990. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂. *J Appl Physiol* (1985), 68 (3):833-842.
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. 2006. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*, 20 (5):557-570.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3 (3):301-313.
- Csete M. 2005. Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1049:1-8.
- D'Angelo G, Duplan E, Boyer N, Vigne P, Frelin C. 2003. Hypoxia up-regulates prolyl hydroxylase activity: a feedback mechanism that limits HIF-1 responses during reoxygenation. *J Biol Chem*, 278 (40):38183-38187.
- De Paepe C, Krivega M, Cauffman G, Geens M, Van de Velde H. 2014. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Mol Hum Reprod*.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174 (3):101-109.
- Dentelli P, Barale C, Togliatto G, Trombetta A, Olgasi C, Gili M, Riganti C, Toppino M, Brizzi MF. 2013. A diabetic milieu promotes OCT4 and NANOG production in human visceral-derived adipose stem cells. *Diabetologia*, 56 (1):173-184.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4):315-317.
- Eliasson P, Jonsson JI. 2010. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*, 222 (1):17-22.
- Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S, McMahon A, Rao M, Pevny L. 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*, 26 (2-4):148-165.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. 2001. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107 (1):43-54.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 109 (1):235-242.

- Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. 2002. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290 (2):763-769.
- Estrada JC, Albo C, Benguria A, Dopazo A, Lopez-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enriquez JA, Bernad A, Samper E. 2012. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ*, 19 (5):743-755.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature*, 292 (5819):154-156.
- Ezashi T, Das P, Roberts RM. 2005. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (13):4783-4788.
- Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Gully C, Gassner R, Lepperdinger G. 2007. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 6 (6):745-757.
- Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. 2010. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*, 139 (1):85-97.
- Fotia C, Massa A, Boriani F, Baldini N, Granchi D. 2014. Hypoxia enhances proliferation and stemness of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*.
- Fraisl P, Aragones J, Carmeliet P. 2009. Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. *Nat Rev Drug Discov*, 8 (2):139-152.
- Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S. 2009. Human cancers converge at the HIF-2alpha oncogenic axis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (50):21306-21311.
- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24 (4):150-154.
- Gage BK, Webber TD, Kieffer TJ. 2013. Initial cell seeding density influences pancreatic endocrine development during in vitro differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS One*, 8 (12):e82076.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*, 100 (9):1249-1260.
- Ginouves A, Ilc K, Macias N, Pouyssegur J, Berra E. 2008. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (12):4745-4750.
- Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH. 2010. Inherent differential propensity of dental pulp stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod*, 36 (9):1504-1515.
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. 2007. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358 (3):948-953.
- Griesche N, Luttmann W, Luttmann A, Stammermann T, Geiger H, Baer PC. A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs*, 192 (2):106-115.
- Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189 (1):54-63.

- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:519-561.
- Hagen T. 2012. Oxygen versus Reactive Oxygen in the Regulation of HIF-1alpha: The Balance Tips. *Biochem Res Int*, 2012:436981.
- Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. 2001. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 7 (6):729-741.
- Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. 2013. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal*, 2013:632972.
- Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. 2001. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 287 (4):808-813.
- Harris DT. 2009. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol*, 147 (2):177-184.
- Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P. 2002. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood*, 99 (1):394.
- Hart AH, Hartley L, Ibrahim M, Robb L. 2004. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Dev Dyn*, 230 (1):187-198.
- Heidbreder M, Frohlich F, Jöhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P. 2003. Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J*, 17 (11):1541-1543.
- Heneidi S, Simerman AA, Keller E, Singh P, Li X, Dumesic DA, Chazenbalk G. 2013. Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS One*, 8 (6):e64752.
- Hogel H, Rantanen K, Jokilehto T, Grenman R, Jaakkola PM. 2011. Prolyl hydroxylase PHD3 enhances the hypoxic survival and G1 to S transition of carcinoma cells. *PLoS One*, 6 (11):e27112.
- Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol*, 11:11.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23 (24):9361-9374.
- Hughes SW, Lorincz ML, Blethyn K, Kekesi KA, Juhasz G, Turmaine M, Parnavelas JG, Crunelli V. 2011. Thalamic Gap Junctions Control Local Neuronal Synchrony and Influence Macroscopic Oscillation Amplitude during EEG Alpha Rhythms. *Front Psychol*, 2:193.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science*, 292 (5516):464-468.
- Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, 99 (5):1285-1297.

- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292 (5516):468-472.
- Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. 2001. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*, 15 (7):1312-1314.
- Jones DL, Wagers AJ. 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9 (1):11-21.
- Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. 1998. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J*, 17 (22):6573-6586.
- Kamata H, Hirata H. 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*, 11 (1):1-14.
- Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen YD, Cheatham B, Storms RW, Gimble JM. 2007. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol*, 212 (3):702-709.
- Kim DS, Lee MW, Yoo KH, Lee TH, Kim HJ, Jang IK, Chun YH, Kim HJ, Park SJ, Lee SH, Son MH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. 2014. Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density. *PLoS One*, 9 (1):e83363.
- Kim JH, Song SY, Park SG, Song SU, Xia Y, Sung JH. 2012. Primary involvement of NADPH oxidase 4 in hypoxia-induced generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 21 (12):2212-2221.
- Kirkinezos IG, Moraes CT. 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 12 (6):449-457.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. 2002. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science*, 295 (5556):858-861.
- Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR. 2005. High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 14 (1):70-80.
- Lee S, Nakamura E, Yang H, Wei W, Linggi MS, Sajan MP, Farese RV, Freeman RS, Carter BD, Kaelin WG, Jr., Schlisio S. 2005. Neuronal apoptosis linked to EglN3 prolyl hydroxylase and familial pheochromocytoma genes: developmental culling and cancer. *Cancer Cell*, 8 (2):155-167.
- Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H. 2006. Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3 α expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1 α . *Cell Res*, 16 (6):548-558.
- Liu L, Gao J, Yuan Y, Chang Q, Liao Y, Lu F. 2013. Hypoxia preconditioned human adipose derived mesenchymal stem cells enhance angiogenic potential via secretion of increased VEGF and bFGF. *Cell Biol Int*, 37 (6):551-560.
- Loewenstein WR, Rose B. 1992. The cell-cell channel in the control of growth. *Semin Cell Biol*, 3 (1):59-79.
- Madonna R, Geng YJ, De Caterina R. 2009. Adipose tissue-derived stem cells: characterization and potential for cardiovascular repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29 (11):1723-1729.
- Mahmood T, Yang PC. 2012. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*, 4 (9):429-434.

- Masson N, Ratcliffe PJ. 2003. HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O(2) levels. *J Cell Sci*, 116 (Pt 15):3041-3049.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. 2001. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*, 20 (18):5197-5206.
- McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. 2006. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24 (5):1246-1253.
- McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horsfall LE, Schofield CJ. 2002. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. *Biochem J*, 367 (Pt 3):571-575.
- Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, Marxsen JH, Stolze I, Klinger M, Huang WQ, Wotzlaw C, Hellwig-Burgel T, Jelkmann W, Acker H, Fandrey J. 2003. Intracellular localisation of human HIF-1 α hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci*, 116 (Pt 7):1319-1326.
- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24 (2):376-385.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*, 109 (1):199-209; discussion 210-191.
- Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 7 (2):150-161.
- Panchision DM. 2009. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol*, 220 (3):562-568.
- Parker AM, Katz AJ. 2006. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther*, 6 (6):567-578.
- Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. 2009. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*, 58 (3):718-725.
- Pescador N, Cuevas Y, Naranjo S, Alcaide M, Villar D, Landazuri MO, Del Peso L. 2005. Identification of a functional hypoxia-responsive element that regulates the expression of the egl nine homologue 3 (egln3/phd3) gene. *Biochem J*, 390 (Pt 1):189-197.
- Picanco-Castro V, Russo-Carbolante E, Covas DT. Forced expression of Nanog in human bone marrow-derived endothelial cells activates other six pluripotent genes. *Cell Reprogram*, 14 (3):187-192.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411):143-147.
- Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Askar SF, Passier R, Swildens J, Goumans MJ, Schutte CI, de Vries AA, Scherjon S, Mummery CL, Schalij MJ, Atsma DE. 2011. Human embryonic and fetal mesenchymal stem cells differentiate toward three different cardiac lineages in contrast to their adult counterparts. *PLoS One*, 6 (9):e24164.

- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18 (4):399-404.
- Rizzino A. 2009. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 1 (2):228-236.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280 (26):24731-24737.
- Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. 1992. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol*, 80 (2):283-285.
- Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 294 (2):371-379.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11 (4):173-186.
- Sauer H, Sharifpanah F, Hatry M, Steffen P, Bartsch C, Heller R, Padmasekar M, Howaldt HP, Bein G, Wartenberg M. 2011. NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap-junctional coupling. *J Cell Physiol*, 226 (6):1642-1650.
- Scadden DT. 2006. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441 (7097):1075-1079.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3 (6):1101-1108.
- Schofield R. 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4 (1-2):7-25.
- Scioli MG, Bielli A, Gentile P, Mazzaglia D, Cervelli V, Orlandi A. 2014. The biomolecular basis of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *Int J Mol Sci*, 15 (4):6517-6526.
- Semenza GL. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol*, 13 (2):167-171.
- Semenza GL. 2011. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76:347-353.
- Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, Gimble JM. 2001. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem*, 81 (2):312-319.
- Sharma R, Raghubir R. 2007. Stem cell therapy: a hope for dying hearts. *Stem Cells Dev*, 16 (4):517-536.
- Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y, Pei D. 2006. Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, 281 (33):23319-23325.
- Simon AM, Goodenough DA. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. *Trends Cell Biol*, 8 (12):477-483.
- Simon MC, Keith B. 2008. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (4):285-296.

- Stamati K, Mudera V, Cheema U. 2011. Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for cell signalling in tissue engineering. *J Tissue Eng*, 2 (1):2041731411432365.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. 2005. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54 (3):132-141.
- Sun LY, Pang CY, Li DK, Liao CH, Huang WC, Wu CC, Chou YY, Li WW, Chen SY, Liu HW, Chang YJ, Cheng CF. 2013. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. *J Biomed Sci*, 20:53.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 (5):861-872.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282 (5391):1145-1147.
- Trosko JE, Chang CC, Wilson MR, Upham B, Hayashi T, Wade M. 2000. Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods*, 20 (2):245-264.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS. 2003. Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells*, 21 (6):681-693.
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, Mounier R, Couette S, Clottes E, Clerici C. 2004. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 α . *J Biol Chem*, 279 (15):14871-14878.
- van Dijk A, Niessen HW, Zandieh Doulabi B, Visser FC, van Milligen FJ. 2008. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res*, 334 (3):457-467.
- Vunjak-Novakovic G, Scadden DT. 2011. Biomimetic platforms for human stem cell research. *Cell Stem Cell*, 8 (3):252-261.
- Wagner AE. 2006. Hemmung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1) durch Glukokortikoide Dissertation.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (12):5510-5514.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. 1998. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood*, 92 (7):2260-2268.
- Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. 1991. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol*, 56 (1):1-7.
- Witkowska-Zimny M, Walenko K. 2011. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett*, 16 (2):236-257.
- Wong RC, Pebay A, Nguyen LT, Koh KL, Pera MF. 2004. Presence of functional gap junctions in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22 (6):883-889.

- Yang XF, He X, He J, Zhang LH, Su XJ, Dong ZY, Xu YJ, Li Y, Li YL. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 18:59.
- Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. 2009. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296 (2):E333-342.
- Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. 2002. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell*, 2 (3):331-341.
- Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. 2005. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23 (3):299-305.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. 2008. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*, 26 (6):664-675.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7 (2):211-228.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13 (12):4279-4295.

11 Anhang

11.1 Ethikvotum



**Universitätsklinikum
Jena**

Ethik-Kommission

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Dagmar Barz
Geschäftsstelle: Dr. phil. Ulrike Skorsetz

Bachstraße 18
07743 Jena

Telefon 03641 93 37 70
Telefax 03641 93 37 71

E-Mail: ethikkommission@med.uni-jena.de

Jena, 11. Mai 2011

Universitätsklinikum Jena · Ethik-Kommission · Postfach 10740 Jena

Prof. Dr. M. Wartenberg
KIM I / Forschungszentrum
Molekulare Kardiologie und
Stammzellforschung
UKJ
07740 Jena

Bearbeitungsnummer: 3100-04/11 (Bitte immer angeben)

Sehr geehrte Frau Kollegin,

in Ihrer Sitzung am 10.05.2011 hat die Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller Universität
Ihren Antrag

*Induktion pluripotenter (iPS) des Menschen aus adulten Fett- abgeleiteten Stammzellen und
deren kardiovaskuläre Differenzierung - Vergleich von Fettgewebeproben unterschiedlichen
Ursprungs*

beraten.

Es bestehen keine ethischen oder berufsrechtlichen Bedenken. Das Vorhaben wird
zustimmend bewertet

Diese Stellungnahme bezieht sich ausschließlich auf Fettgewebe aus der Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. med. D. Barz
Vorsitzende der Ethik-Kommission

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 37 70
Internet: www.uniklinikum-jena.de
Geschäftsbereich Jena
Bauverwaltung 501 | 144 | 02970 | USt-IdNr.: DE 158545771
Internet-Verbindung:
Sparkasse Jena · BLZ 850 500 20 · Konto 331

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts
als Teilgesellschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Vertretungsorgane: Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deusch
Medizinischer Vorstand:
und Sprecher des Ethikkomitees: Prof. Dr. Klaus Hübner
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Bernhardt
Kaufmännischer Vorstand: Dr. Gerdhild Seidel-Kern

11.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Jennifer Rebhan
Anschrift	An der Müß 157 96515 Sonneberg
Geburtsdatum	04.07.1987
Geburtsort	Sonneberg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1998 – 06/2006	Staatliches Gymnasium Sonneberg, Abitur
-------------------	---

Studium

10/2007 – 12/2013	Friedrich-Schiller-Universität Jena <u>Fachgebiet:</u> Studium der Humanmedizin
-------------------	--

20.11.2013	Ärztliche Prüfung
12.12.2013	Approbation als Ärztin

Promotion

seit 07/2013	Forschungszentrum, Universitätsklinikum Jena <u>Bereich:</u> Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung <u>Betreuer:</u> Prof. Dr. Maria Wartenberg
--------------	--

Berufserfahrung

02/2014 – 07/2014	SocraTec R&D GmbH Erfurt Prüfärztin zur Planung / Durchführung klinischer Studien Leiter: Dr. med. Frank Donath
-------------------	---

ab 11/2014	Ärztin in Weiterbildung im Fach Pädiatrie Ilm-Kreis-Kliniken Arnstadt-Ilmenau gGmbH Klinik für Kinder-und Jugendmedizin Chefarzt: Dr. med. Detlef Stein
------------	--

11.3 Publikationen und Posterbeiträge

Publikationen

Bekhite MM, Finkensieper A, Rebhan J, Huse S, Schultze-Mosgau S, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Hypoxia, leptin and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 23 (4):333-351.

Posterbeiträge

Rebhan J, Huse S, Bekhite MM, Finkensieper A, Schultze-Mosgau S, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. Therapeutisches Potential fettabgeleiteter Stammzellen (ADSC). Wettbewerb der Nachwuchswissenschaften Jena 2012.

11.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Wartenberg für die fachlich kompetente Betreuung und die Korrektur meiner Dissertation danken.

Mein besonders herzlicher Dank geht an Dr. Andreas Finkensieper, der durch sein Engagement, seinen Ehrgeiz und seine unnachgiebigen, aber doch charmanten Bestrebungen für weiterführende Versuche, ein stärkeres wissenschaftliches Interesse sowie Antrieb zu neuen Experimenten bei mir erweckte. Zudem möchte ich mich für seine unendliche Geduld, seine wertvollen Tipps und Hilfestellungen und die humorvolle und angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Figulla gebührt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel für diese Arbeit, sowie der Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu dürfen.

Die freundschaftliche Atmosphäre und gegenseitige Hilfe im Labor hat bei so manchem Rückschlag, bei langen Arbeitszeiten bis spät in die Nacht und ständigem Wiederholen von Versuchen, den nötigen Mut und die Energie zum Weitermachen geschaffen. Hierfür möchte ich vor allem Stefanie Huse danken, die sowohl im Labor als auch außerhalb der Laborräume stets für mich da war und der ich Vieles zu verdanken habe.

Ich danke außerdem Martina Voigt für die liebevolle Unterstützung im Labor, fürs Zuhören und Motivieren.

Bei Dr. Mohamed Bekhite möchte ich mich für seine liebenswerte Art und seine fachliche Hilfe bedanken.

Ein weiterer Dank geht an meine Freunde und meine Familie, die während der gesamten Zeit und auch in schlechten Momenten hinter mir standen.

11.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. rer. nat. Maria Wartenberg

Dr. Andreas Finkensieper,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Jennifer Rebhan